

**Departamento de Bioquímica e Imunologia**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Universidade Federal de Minas Gerais**

**Felipe Tadeu Fiorini Gomide**

**Otimização de produção, purificação e caracterização  
parcial de lipases produzidas pela levedura *Moniliella  
spathulata* R25L270**

**Belo Horizonte**

**2012**

**Felipe Tadeu Fiorini Gomide**

**Otimização de produção, purificação e caracterização  
parcial de lipases produzidas pela levedura *Moniliella  
spathulata* R25L270**

Dissertação apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Bioquímica.

**Orientador:** Marcelo Matos Santoro

**Co-orientadora:** Vera Lúcia dos Santos

**Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Belo Horizonte  
2012**

Otimização de produção, purificação e caracterização parcial de lipases produzidas pela levedura *Moniliella spathulata* R25L270.

Felipe Tadeu Fiorini Gomide

Dissertação submetida ao corpo docente do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Banca Examinadora

---

Prof. Marcelo Matos Santoro. D.Sc

---

Prof<sup>a</sup>. Vera Lúcia dos Santos D.Sc

---

Prof. Gecenir Colen. D.Sc

---

Prof. Carlos Edmundo Salas Bravo. D.Sc

---

Prof. Roberto Gonçalves Junqueira. D.Sc

Belo Horizonte

2012

III

"Com grandes poderes vêm grandes responsabilidades"

**Ben Parker**



## Agradecimentos

Esse mestrado que encabecei foi o resultado da equipe que acreditou nesse projeto de pesquisa e em meu projeto de vida.

Obrigado a todos os meus professores que me ensinaram os primeiros passos.

Obrigado ao orientador Marcelo Santoro, que impressiona pelo seu raciocínio, pelos comentários de enriquecimento para o trabalho, que desde meu primeiro período de graduação me aceitou em seu laboratório.

Obrigado à coorientadora Vera Lúcia dos Santos que abriu com coragem janelas para aprimoramento da minha visão e atuação.

O front de batalha foi decisivo para a conquista desses objetivos. Eternos agradecimentos ao Jamil Silvano: um professor, um amigo, uma lenda. Aprendi a trabalhar de verdade contigo e com Alexandre, que juntos me ensinaram tanto que não teria como medir e agradecer. Logicamente também à Janaína Guernica e Edésia.

Foi um prazer trabalhar em companhia dos colaboradores de iniciação científica desse projeto: Pedro, Camila, Luciana, e em especial Priscila e Lorena que foram meus neurônios e meus braços: vocês foram incríveis. Vocês são incríveis.

Aos meus eternos amigos de Laboratório: Thais, Jacqueline, Ângelo, Maria, Andréia, Elândia, William, Tamires, Moema, e também a Livia, com quem as discussões sobre a lipase foram muito melhores e felizes em todos os sentidos, sem me esquecer da Maristela.

Queria agradecer ao Professor Luiz Carlos Mimim por permitir o aprendizado sobre a técnica da extração líquido-líquido e à Lizzy por todo o conhecimento compartilhado e pela sua enorme paciência diante às minhas dificuldades. Também aos amigos do LMA, onde fiz muitas amizades. Em especial ao Daniel Bonoto que contribuiu enormemente para a melhoria desse trabalho. Também aos professores e amigos dos laboratórios do Luiz Carlos Rosa, Ronaldo Nagem e Maria de Fátima – PATIU por permitirem a minha presença e a utilização das suas dependências.

Aos meus amigos e à minha família que fazem parte do meu projeto de vida. Aos meus pais, meu irmão, Pimpz e padrinhos que fazem da minha vida cheia de amor.

Obrigado meu bom Deus! Olho para meu passado e para quem está ao meu lado hoje e vejo que no amor cada um sempre estivemos juntos.

Resumo da Dissertação apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

## Otimização de produção, purificação e caracterização parcial de lipases produzidas pela levedura *Moniliella spathulata* R25L270.

Felipe Tadeu Fiorini Gomide

Julho/2012

Orientador: Marcelo Matos Santoro

Co-orientadora: Vera Lúcia dos Santos

Programa: Bioquímica e Imunologia

### RESUMO

Neste trabalho foram estudadas as principais variáveis e seus níveis que influenciam na produção da(s) lipase(s) de *Moniliella spathulata* R25L270, além da purificação cromatográfica parcial desta(s) enzima(s) e caracterização das frações recolhidas. Sendo assim, executou-se um planejamento fatorial de níveis mistos L18, seguido de dois planejamentos fatoriais completos ( $2^3+1$ ) de um meio de cultura contendo 0,1% de peptona, 0,02% de  $\text{NaNO}_3$  e uma das duas fontes de carbono (glicerol ou óleo de oliva). Percebeu-se que para glicerol como fonte de carbono, as variáveis [C], pH,  $\text{PO}_4$  proporcionaram melhores condições de produção da enzima nas concentrações de 9,0%, 6,5 e 0,1% respectivamente. Para a otimização com o óleo de oliva foi encontrada a melhor condição nas concentrações de 6,5 e 0,1% das variáveis pH e  $\text{PO}_4$  respectivamente. Notou-se também que as fontes de carbono modificavam o padrão de produção das enzimas. A melhor condição de purificação foi alcançada empregando precipitação com sulfato de amônio, ultrafiltração em sistema Amicon® e cromatografia de gel filtração, que possibilitou o isolamento de dois pools de atividade obtidos, cada um, em uma distinta fração de saturação de sulfato de amônio. As frações obtidas a partir dos extratos de 60 e 80% de saturação obtiveram distintas atividades máximas para diferentes ésteres alquílicos de ácidos graxos, cátions, pH e temperaturas, indicativas da existência da produção de pelo menos duas diferentes lipases por *Moniliella spathulata* R25L270.

Abstract of the dissertation submitted to the Department of Biochemistry and Immunology,  
Institute of Biological Sciences of the Federal University of Minas Gerais, as part of the  
requirements for obtaining the degree of master of Science (M.Sc.)

## Optimization of production, purification and partial characterization of lipase produced by the yeast *Moniliella spathulata* R25L270.

Felipe Tadeu Fiorini Gomide

July/2012

Advisor: Marcelo Matos Santoro

Co-advisor: Vera Lúcia dos Santos

Department: Biochemistry and Immunology

### ABSTRACT

In this work, the main variables and their levels that influence the production of lipase(s) of *Moniliella spathulata* R25L270 were studied, in addition to the chromatographic purification of these enzyme(s) and characterization of the fractions collected. Thus, it was executed a mixed level factorial design L18, followed by two full factorial designs ( $2^3+1$ ) of a culture medium containing 0.1% peptone, 0.02% of NaNO<sub>3</sub> and one of two carbon sources (glycerol or olive oil). It was realized that, for glycerol as a source of carbon, the variables [C], pH and PO<sub>4</sub> provided the best conditions for enzyme production in concentrations of 9.0%, 6.5 and 0.1%, respectively. For the optimization with the olive oil it was found the best condition in concentrations of 6.5 and 0.1% of the variables pH and PO<sub>4</sub> respectively. It was also noted that the carbon sources would modify the production of enzymes. The best condition of purification was reached using ammonium sulphate precipitation, ultrafiltration in Amicon<sup>®</sup> systems and gel filtration chromatography that allowed the isolation of two activity pools, each in a distinct fraction of saturation ammonium sulfate. The fractions obtained from the extracts of 60 and 80% of saturation obtained maximum activities for different alkyl esters of fatty acids, cations, pH and temperature, a strong indication of the production of at least two different lipases by *Moniliella spathulata* R25L270.

## SUMÁRIO

### SUMÁRIO VIII

LISTA DE ABREVIATURAS .....	XI
LISTA DE ANEXOS.....	XIII
LISTA DE FIGURAS.....	XIV
1. Introdução .....	1
2. Objetivo Geral .....	28
2.1. Objetivos específicos .....	28
3. Metodologia.....	29
3.1. Otimização do cultivo .....	29
3.1.1. Delineamento do planejamento fatorial para seleção de variáveis significativas sobre a produção de lipases e compostos tensoativos por <i>M. spathulata</i> R25L270. ....	29
3.1.2. Definição da formulação matemática capaz de determinar as quantidades de sais de fosfato para a serem adicionados no meio de cultura a um certo pH para sua preparação.....	29
3.1.3. Delineamento fatorial de níveis mistos L18 .....	29
3.1.4. Delineamento fatorial completo ( $2^k+1$ ).....	30
3.1.5. Determinação das razões molares de sais de fosfato para obtenção de meios de cultivo com valores de pH definidos. ....	30
3.1.1. Delineamento do planejamento fatorial para seleção de variáveis estudadas sobre a atividade lipásica de <i>M. spathulata</i> R25L270.....	34
3.2. Preparo do inóculo para cultivo .....	35
3.2.1. Monitoramento do crescimento celular .....	35
3.2.2. Atividade emulsificante no sobrenadante de meio de cultura .....	35
3.3. Ensaio de purificação das enzimas lipases.....	36
3.3.1. Cultivo das leveduras .....	36
3.4. Ensaio de padronização da purificação de lipase .....	36
3.4.1. Ensaio de padronização das metodologias de separação pelo rastreamento de atividade das frações eluídas da enzima a partir de cultivo não otimizado.....	36
3.4.1.1. Estratégias de purificação adotadas.....	36
3.4.1.1.1. Padronização da purificação parcial por sulfato de amônio .....	38
3.4.1.1.2. Purificação parcial por ultrafiltração.....	39
3.4.1.1.3. Cromatografia de Gel Filtração.....	39
3.4.1.1.4. Cromatografia de Troca aniônica .....	39
3.4.1.1.5. Cromatografia de Troca catiônica.....	39

3.4.1.1.6.	Cromatografia de Fase Reversa.....	40
3.4.1.1.7.	Cromatografia de Afinidade.....	40
3.5.	Estudo do efeito de diferentes solventes orgânicos na atividade lipásica para escolha da fase móvel da cromatografia de fase reversa.....	40
3.6.	Espectrometria de Massas pelo método de Ionização por Desorção Assistida por Matriz (MALDI).....	40
3.7.	Atividade enzimática pelo substrato sintético 4-nitrofenil palmitato.....	41
3.8.	Dosagem protéica dos sobrenadantes de cultivo e das frações recolhidas nos procedimentos cromatográficos.....	42
3.9.	Caracterização da atividade enzimática das frações purificadas de <i>M. spathulata</i> R25L270.....	43
3.9.1.	Caracterização da atividade enzimática das frações frente diferentes <i>p</i> -fenil esterres de ácidos graxos.....	43
3.9.2.	Caracterização da atividade enzimática das frações frente a diferentes temperaturas.....	43
3.9.3.	Caracterização da atividade enzimática das frações frente a diferentes cátions.....	43
3.9.4.	Caracterização da atividade enzimática das frações frente a diferentes valores de pH.....	44
4.	Resultados e discussão.....	45
4.1.	Delineamento fatorial de Níveis Mistos L18.....	45
4.2.	Otimização do cultivo: Delineamento Fatorial completo ( $2^k + 1$ ).....	56
4.2.1.	Otimização para Óleo de Oliva.....	56
4.3.2.	Otimização para Glicerol.....	60
4.4.	Ensaio de padronização da purificação de lipase.....	65
4.4.1.	Padronização da purificação parcial por sulfato de amônio.....	65
4.4.2.	Ensaio de padronização das metodologias de separação pelo rastreamento de atividade das frações eluídas da enzima a partir de cultivo não otimizado.....	66
4.4.2.1.	Estratégia inicial.....	66
4.4.2.1.1.	Cromatografia de exclusão molecular.....	66
4.4.2.1.2.	Cromatografia de fase reversa.....	71
4.4.2.1.3.	Cromatografia de troca iônica.....	75
4.4.2.1.3.1.	Cromatografia de troca aniônica.....	76
4.4.2.1.3.2.	Cromatografia de troca catiônica.....	79
4.4.3.	Purificação da lipase pela estratégia 2 e identificação da influência das fontes de carbono no meio de cultivo sobre padrão de produção de lipases por <i>M. spathulata</i> R25L270.....	79

4.4.3.1.	Cromatografias de gel filtração e identificação da influência das fontes de carbono no meio de cultivo sobre padrão de produção de lipases por <i>M. spathulata</i> R25L270. ....	81
4.4.3.2.	Cromatografias de troca aniônica .....	82
4.4.3.3.	Cromatografias de afinidade .....	87
4.4.3.1.	Cromatografia de fase reversa: Estudo do efeito de diferentes solventes orgânicos na atividade lipásica para escolha da fase móvel da cromatografia de fase reversa .....	95
4.4.4.	Separação por ultrafiltração .....	96
4.4.5.	Purificação parcial das lipases através das técnicas padronizadas mais efetivas.....	97
4.5.	Caracterização da atividade enzimática das frações parcialmente purificadas de <i>M. spathulata</i> R25L270. ....	103
4.5.1.	Caracterização da atividade enzimática das frações frente a diferentes <i>p</i> -fenil esterres de ácidos graxos .....	103
4.5.2.	Caracterização da atividade enzimática das frações frente a diferentes temperaturas .....	104
4.5.3.	Caracterização da atividade enzimática das frações frente a diferentes cátions.....	106
4.5.4.	Caracterização da atividade enzimática das frações frente a diferentes valores de pH.....	108
5.	Conclusões .....	110
6.	Perspectivas.....	112
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	113
	ANEXOS .....	127

## LISTA DE ABREVIATURAS

% – percentual (massa / volume)

$\Delta_{mix}G$  – energia livre de mistura

$K_p$  – coeficiente de partição

$\bar{x}$  – média

$\mu\text{L}$  – microlitros

ACN – acetonitrila

B3 – diesel com 3% de biodiesel em sua composição

B5 – diesel com 5% de biodiesel em sua composição

BCA – Ácido Bicinconínico

$\text{CO}_2$  e – equivalentes de dióxido de carbono

DCCR – delineamento composto central rotacional

DHB – ácido 2,5 dihidroxibenzóico

DMSO – dimetilsulfóxido

DO – densidade ótica

DOE – Design of Experiments

FPLC – fast performance liquid chromatography (cromatografia líquida de rápida execução)

g – grama

$g$  – gravidades (força centrífuga relativa à gravidade)

h – hora

HPLC – high performance liquid chromatography (cromatografia líquida de alta eficiência).

IPCC – *Intergovernmental Panel of Climate Change* (painel intergovernamental de mudança climática).

IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry* (União Internacional de Química Pura e Aplicada).

kDa – quilodaltons

L – litro

lipA – lipase A

lipB – lipase B

MALDI – *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization* (Ionização por Desorção Assistida por Matriz)

min – minuto

mL – mililitro

mol –  $6,023 \cdot 10^{23}$  unidades

mV – milivolt

nm – nanômetros

NMWL – *Nominal Molecular Weight Limit* (Limite de peso molecular nominal)

°C – graus célsius

pH – potencial hidrogeniônico

pNP – paranitrofenol

pNPD – 4–nitrofenil decanoato

pNPM – 4–nitrofenil miristato

pNPP – 4–nitrofenil palmitato

ppm – concentração em partes por milhão

rpm – rotações por minuto

$r^2$  – coeficiente de determinação

S – variância

TFA – Ácido trifluoroacético

TOF – Time of flight (tempo de voo)

UV – ultravioleta

$\alpha$  – alfa

$\beta$  – beta

$\lambda$  – comprimento de onda

$\omega$ -3 – ácido docosahexaenóico (ômega 3)

$pK_a$  – negativo do logaritmo da constante de dissociação do ácido



## LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 - Fluxograma da Estratégia 2 de padronização da purificação de lipase de <i>Moniliella spathulata</i> R25L270. ....	127
Anexo 2 – Planejamento Fatorial de níveis mistos L18: Variáveis codificadas .....	128
Anexo 3 – Resultados de atividade enzimática do sobrenadante dos tratamentos do Planejamento Fatorial de níveis mistos L18. ....	129
Anexo 4 – Volume a ser adicionado (mL) das soluções estoques (0,5g/L) para preparação de cultivo de 150mL .....	130
Anexo 5 – Plano fatorial de níveis mistos L36. ....	131
Anexo 6 – Plano fatorial de níveis mistos L36 com níveis reais das variáveis. ....	132
Anexo 7 – Tabela de concentração de saturação de sulfato de amônio .....	133

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura molecular do biodiesel. ....	4
Figura 2 - Reação de transesterificação dos triglicerídeos pela rota alquílica. ....	7
Figura 3 - Posicionamento da estrutura secundária que compõe a tampa na ativação da lipase. ....	12
Figura 4 - Estrutura tridimensional da lipase de <i>Serratia marcescens</i> (PDB 2qua). ....	13
Figura 5 - Mecanismo geral da transesterificação por Lipase. ....	15
Figura 6 - Fluxograma das padronizações da purificação de lipase de <i>Moniliella spathulata</i> R25L270 e metodologia de purificação parcial da enzima. ....	37
Figura 7 - Reação de hidrólise do 4-nitrofenil palmitato (pNPP). ....	42
Figura 8 – Variação da atividade enzimática microbiana em relação ao tratamento e o tempo de cultivo. ....	47
Figura 9 - Gráficos dos efeitos produzidos pelas médias dos níveis das variáveis na resposta de atividade lipásica. ....	48
Figura 10 – Curva de contorno da influência das variáveis de estudo na atividade enzimática. ....	50
Figura 11- Efeitos das médias dos níveis das variáveis na resposta de DO.. ....	51
Figura 12 - Efeitos das médias dos níveis das variáveis na resposta de dosagem protéica. ....	54
Figura 13 - Efeitos das médias dos níveis das variáveis na resposta de atividade normalizada. ....	54
Figura 14 – Efeitos das médias dos diferentes níveis das variáveis pH e PO <sub>4</sub> na resposta de atividade enzimática para o cultivo de <i>Moniliella spathulatha</i> R25L270 com fonte de carbono óleo de oliva no delineamento fatorial completo.. ....	59
Figura 15 - Efeitos das médias dos diferentes níveis das variáveis [C], pH e PO <sub>4</sub> na resposta de atividade enzimática para o cultivo de <i>Moniliella spathulatha</i> R25L270 com fonte de carbono glicerol no delineamento fatorial completo. ....	61

Figura 16 – Efeito de interação de segunda ordem das variáveis [C] e PO4 em combinação significativa sobre a atividade enzimática do sobrenadante de <i>Moniliella spathulatha</i> R25L270 para o quinto de cultivo..	62
Figura 17 – Espaço de resposta para a atividade enzimática no fatorial completo de glicerol como fonte de carbono.	62
Figura 18 – Atividade lipásica nos extratos obtidos em diferentes porcentagens de saturação de sulfato de amônio..	65
Figura 19 – Perfil cromatografico exploratório de Gel Filtração em coluna Superose® 12 HR 10/30 do extrato em 60 % de saturação.....	68
Figura 20 - Perfil cromatografico exploratórip de Gel Filtração em coluna Superose® 12 HR 10/30 do extrato em 80 % de saturação.....	69
Figura 21 - Cromatografia de fase reversa do pool das frações 2 e 3 advindas da cromatografia de Gel Filtração em coluna Aquapore RP300 (Perkin Elmer®).	73
Figura 22 - Cromatografia de fase reversa do pool das frações 10 e 11 advindas da cromatografia de Gel Filtração em coluna Aquapore RP300 (Perkin Elmer®).	74
Figura 23 - Espectro de massas da amostra 6 obtida pela cromatografia de fase reversa do extrato concentrado do pool das frações 10 e 11 isoladas por exclusão molecular do extrato de 80 % do sobrenadante de cultivo.	75
Figura 24 - Cromatografia de Troca Aniônica do pool das frações 2, 3 e 4 com atividade lipásica vindas da cromatografia de gel filtração do extrato de 80% de saturação.....	77
Figura 25 – Cromatografia de Troca Aniônica do pool das frações 10 e 11 com atividade lipásica vindas da cromatografia de gel filtração do extrato de 80% de saturação.....	78
Figura 26 - Cromatografia de Troca catiônica das frações 3 a 7 vindas de cromatografia de gel filtração.....	80
Figura 27 - Perfil da cromatografia de Gel Filtração em coluna Superose® 12 HR 10/30 com extrato em 60% de saturação do cultivo com fonte de carbono glicerol.	83
Figura 28 - Perfil da cromatografia de Gel Filtração em coluna Superose® 12 HR 10/30 com extrato em 60% de saturação do cultivo com fonte de carbono óleo de oliva.....	84

Figura 29 - Perfil da cromatografia de Gel Filtração em coluna Superose® 12 HR 10/30 com extrato em 80% de saturação do cultivo com fonte de carbono glicerol. ....	85
Figura 30 - Perfil da cromatografia de Gel Filtração em coluna Superose® 12 HR 10/30 com extrato em 80% de saturação do cultivo com fonte de carbono óleo de oliva. ....	86
Figura 31 - Cromatografia de troca aniônica do extrato de 80 % de saturação do pool das frações 4 5 e 6 obtidas na gel filtração de cultivo com glicerol. ....	88
Figura 32 - Cromatografia de troca aniônica do extrato de 60 % de saturação do pool das frações 2 e 3 obtidas na gel filtração de cultivo com glicerol. ....	89
Figura 33 - Cromatografia de Afinidade à Heparina do pool de atividade recolhido na cromatografia de troca iônica advindo do pool das frações 2 e 3 da cromatografia de gel filtração do extrato de 60 % de saturação a partir do sobrenadante de cultivo com glicerol. ....	92
Figura 34 - Cromatografia de Afinidade à Heparina do pool de atividade recolhido na cromatografia de troca iônica advindo do pool das frações 4, 5 e 6 da cromatografia de gel filtração do extrato de 60 % de saturação a partir do sobrenadante de cultivo com glicerol. ....	93
Figura 35 - Eletroforese das frações com atividade lipásica.....	94
Figura 36 - Efeito de solventes puros na atividade lipásica de amostras de sobrenadante livre de células de cultivos de <i>M. spathulada</i> R25L270. Isoprop = isopropanol.....	95
Figura 37 - Padronização do sistema de filtração Amicon de 30kDa com amostras avindas da precipitação por sulfato de amônio. ....	96
Figura 38 - Perfil da cromatografia de Gel Filtração em coluna Superose® 12 HR 10/30 dos extratos do cultivo com fonte de carbono óleo de oliva. ....	98
Figura 39 - Eletroforese das frações purificadas na última estratégia com 10 % de acrilamida: .....	100
Figura 40 - Atividade relativa para diferentes p-fenil ésteres de ácidos graxos das frações purificadas a partir do extrato de 60% (azul) e 80% (vermelho) de saturação por sulfato de amônio. ....	103

Figura 41 - Atividade relativa para diferentes temperaturas das frações purificadas a partir do extrato de 60% (azul) e 80% (vermelho) de saturação por sulfato de amônio. .... 104

Figura 42 - Atividade relativa para diferentes cátions das frações purificadas a partir do extrato de 60% (azul) e 80% (vermelho) de saturação por sulfato de amônio..... 106

Figura 43 - Atividade relativa para diferentes pH das frações purificadas a partir do extrato de 60% (azul) e 80% (vermelho) de saturação por sulfato de amônio..... 109

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores reais dos níveis de cada fator avaliado no delineamento fatorial de níveis mistos L18 .....	30
Tabela 2 – pH em função da razão das massas dos sais de fosfato monobásico/dibásico em solução .....	32
Tabela 3 – Plano do fatorial de níveis mistos L36 .....	34
Tabela 4 – Resultados de atividade, densidade ótica, dosagem protéica e atividade normalizada por proteína para os diferentes tratamentos do delineamento de níveis mistos L18. ....	46
Tabela 5 – Atividade média da enzima para os níveis inferior e superior ( $U.L^{-1}$ ) do planejamento fatorial de níveis mistos da seção 3.1.2 para cada nível das variáveis..	46
Tabela 6 – Efeito das variáveis sobre a médias das atividades ( $U.L^{-1}$ ). ....	48
Tabela 7 – Efeito das variáveis sobre a médias das densidades óticas (DO). ....	51
Tabela 8 - Efeito das variáveis sobre a médias para médias das dosagens protéicas ( $\mu g/mL$ ). ....	52
Tabela 9 – Coeficientes de regressão para médias das atividades das enzimas lipases normalizadas pela dosagem protéica ( $U.L/\mu g$ ) .....	53
Tabela 10 – Delineamento fatorial completo ( $2^3+1$ ) com 4 repetições no ponto central para seleção das variáveis (codificadas e não codificadas) que influenciam nas respostas de atividade e atividade emulsificante de <i>Moniliella spathulata</i> R25L270 com glicerol e óleo de oliva como fontes de carbono. ....	56
Tabela 11 – Coeficientes de regressão e tabela ANOVA para médias da porcentagem de emulsificante ( $\%_{(v/v)}$ ) no décimo primeiro dia do planejamento fatorial completo com óleo de oliva. ....	57
Tabela 12 – Coeficientes de regressão e tabela ANOVA para as médias das atividades ( $U.L^{-1}$ ) para o quinto dia de cultivo do planejamento fatorial completo com óleo de oliva. ....	58

Tabela 13 – Coeficientes de regressão e tabela ANOVA para as médias das atividades (U.L <sup>-1</sup> ) para o quinto dia de cultivo do planejamento fatorial completo com glicerol.....	60
Tabela 14 – Tabela de Rendimento de purificação do planejamento de purificação ...	90
Tabela 15– Rendimentos da purificação parcial padronizada de lipase a partir do cultivo com óleo de oliva.....	101

## 1. Introdução

O modelo energético vigente enfrenta séria crise no seu cenário de perspectivas atuais para se manter principalmente a médios e longos prazos. Esse modelo é baseado no uso dos derivados do petróleo como a nafta, gasolina, querosene, diesel, dentre outros, cujas substâncias fornecem suprimento combustível para promover as atividades humanas. A dificuldade da perpetuação desse sistema advém das repercussões ambientais negativas do uso desses combustíveis. Ademais, o decréscimo das reservas disponíveis de petróleo e de seu fornecimento e a ameaça do crescimento do mercado de energia têm aumentado o ritmo na busca desses combustíveis, dentre outras razões (IPCC, 2007).

WEO (2009) reporta a crescente demanda desses combustíveis na ordem de 1,5% ao ano acarretando em um aumento líquido no consumo em torno de 40% até 2030. Para o ano de 2008, o cenário de consumo para os combustíveis fósseis girava em torno de 81 milhões de barris de petróleo e 260 bilhões de metros cúbicos de gás natural (Vasudevan et al., 2008). Em contrapartida as reservas de petróleo para atender a esse mercado não ultrapassariam 40 anos de suprimento para o petróleo e 64 anos para o gás natural (Vasudevan et al., 2008).

O uso dos atuais combustíveis fósseis implica na combustão de seus derivados, quando não, da própria matéria-prima, o petróleo, liberando CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O além de outras substâncias que permanecem dissolvidas no ar atmosférico ou mesmo suspensas. Esses compostos, em conjunto, têm provocado alterações climáticas preocupantes, além de serem responsáveis por causar chuvas ácidas, diminuição da camada de ozônio, aquecimento global e danos à saúde (IPCC 2009; Agarwal et al. 2007, Naik et al., 2010).

Desde principalmente a publicação dos últimos trabalhos mais amplos do Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas – IPCC (*Intergovernmental Panel on Climate Change*) que associa o aumento da temperatura global com o uso de combustíveis fósseis (IPCC, 1995; IPCC, 2007), foi conhecido o urgente cenário climático em que o planeta se encontra. Uma vez que indícios consistentes que relatam danos consequentes de um aquecimento global (Ribeiro, 2008; Kerr, 2006), percebeu-se intensa repercussão na mudança dos discursos e práticas na sociedade no contexto nacional e internacional. Mas também, a defesa das mudanças climáticas é alvo de críticas e descréditos, além de ser foco de análise (Felicio & Onça, 2010; Tripoli et al., 2008; Peattie & Crane 2005).



Sabe-se que de todo o CO<sub>2</sub> produzido atualmente, apenas metade é absorvido pelos ecossistemas (Cox et al., 2011), acarretando no aumento gradativo de suas concentrações gradativamente. Os níveis atmosféricos CO<sub>2</sub>-e (CO<sub>2</sub> equivalente – resultado da multiplicação das toneladas emitidas de gases de efeito estufa pelo potencial de aquecimento global dessas substâncias) já ultrapassaram a quota de 450 ppm (concentração em partes por milhão). Esse aumento tem ajudado a reforçar a retenção de energia pelo planeta, acarretando no agravamento do efeito estufa (Schenk et al., 2008). No início da era pré-industrial esses mesmos níveis atingiam o valor de 280 ppm em média (Agarwal et al., 2007). IPCC (2009) mostra em um de seus últimos relatórios, registros de temperatura superficial terrestre e relaciona esse efeito ao uso dos combustíveis de petróleo. Também, entre 15 a 37% das espécies de regiões correspondentes a 20% do planeta estão sujeitas a serem ameaçadas de extinção em consequência do aquecimento global para uma previsão de médio risco de elevação da temperatura da Terra (Thomas et al., 2004).

Diante desse cenário muito preocupante, os biocombustíveis se apresentam como soluções tecnológicas para amenizar a crise decorrente do uso dos derivados do petróleo (Agarwal et al., 2007; Balat & Balat, 2008).

Entretanto, em Minas Gerais no ano de 2010, apenas um grupo de pesquisa em energias renováveis era relacionado à bioquímica. Esse, por sua vez, focava seus estudos na área de celulose e papel, representando 1,9% do total de grupos de pesquisa instalados no estado. A representatividade relativa dos grupos de pesquisa relacionados à microbiologia somava apenas 5,6% do montante no estado. Dos 54 grupos existentes apenas 14 tinham relacionamento com o setor produtivo através de trabalhos com alguma possibilidade de aplicação prática. No ano de 2009 apenas 9,95% dos artigos publicados relacionados com energias renováveis no país originaram-se do estado de terceiro maior produto interno bruto, Minas Gerais. Também, analisando os trabalhos indexados naquele ano no ISI (*Institute for Scientific Information*) relacionados aos biocombustíveis no estado, apenas 9,8% dos mesmos se relacionaram aos temas de biotecnologia e microbiologia aplicada (Barros, 2010). Isso demonstra a necessidade de haver maior formação profissional especializada no estado que tenha propostas de impacto na sociedade.

A necessidade de uma resposta coerente com o nível das ameaças surgidas com o aquecimento global, sobretudo relacionada ao uso dos combustíveis fósseis, faz da pesquisa científica focada em alternativas como biocombustíveis ser uma prioridade. Isso porque os biocombustíveis podem minimizar os efeitos do uso dos

combustíveis fósseis já que ambos competem no mesmo segmento do mercado de energia.

O dióxido de carbono liberado na queima desses novos combustíveis pode ser absorvido da atmosfera pelos organismos necessários para produção da matéria prima dos biocombustíveis, reduzindo as emissões globais de CO<sub>2</sub> (Naik et al., 2010). Deve-se lembrar também que a solução tecnológica dos biocombustíveis visa a resolver um problema ambiental relacionado ao uso direto dos combustíveis de petróleo no setor de transportes, que representa um terço de toda a energia consumida no mundo (Oliveira & Franca, 2009).

Existem os mais variados tipos de biocombustíveis como: biomassa, biogás, álcoois primários, óleos vegetais, biodiesel (Agarwal et al., 2007; RCEP, 2004). Eles podem ser separados entre os biocombustíveis de primeira geração, que são aqueles produzidos pelos bioprodutos vegetais e os de segunda geração, produzidos, sobretudo, a partir da biomassa dos organismos vivos (Naik et al., 2010).

No entanto, os biocombustíveis de primeira geração como o biodiesel e o etanol de milho ou de cana de açúcar enfrentam críticas principalmente sobre a pressão que as lavouras de culturas vegetais necessárias para produzi-los exercem sobre as terras designadas para o plantio alimentar. Também tem sido criticada a forma com que o aumento dessas lavouras para a produção desses biocombustíveis têm causado impactos sobre a biodiversidade (Naik et al., 2010).

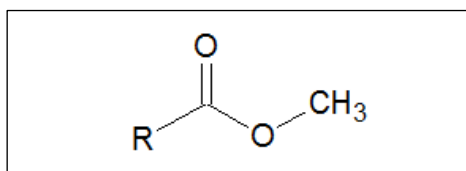
Os biocombustíveis de segunda geração utilizam fontes distintas de matéria prima para sua síntese em comparação com os biocombustíveis de primeira geração. Citam-se fontes de matérias primas alternativas como, por exemplo, as biomassas vegetais de culturas não alimentares, resíduos vegetais e até óleos advindos da biomassa de algas ou de outros microrganismos (Naik et al., 2010). O uso efetivo dos biocombustíveis de segunda geração no mercado de energia é projetado para iniciar na década de 2020 (WEO, 2009).

O investimento para o setor de biocombustíveis é ainda ligado ao custo de produção do petróleo. Não é dependente somente do custo de produção do biocombustível substituto. Mas também envolve questões técnicas que não estão resolvidas para o pleno uso da forma alternativa de energia (Naik et al., 2010). Também deve ser levado em consideração que as barreiras de legislação que estipulam limites de mistura entre o combustível derivado de petróleo e o alternativo dificultam o uso dos novos combustíveis (WEO, 2009). Diante das tecnologias

existentes, um biocombustível candidato a substituir os derivados de petróleo deve ser bem adaptado aos atuais motores, ter uma infraestrutura de produção mais barata, tão bem quanto devem ser baratos os custos associados de manutenção dos motores ao usá-los, além de que os novos combustíveis devem ser ambientalmente menos nocivos (Agarwal et al., 2007).

Muito embora o seu uso já tivesse sido postulado no início do século 20 por Rudolph Diesel (Narashimharao et al., 2007, Balat & Balat, 2008), o uso direto dos óleos vegetais como combustíveis para operar motores diesel alternativamente ao combustível de petróleo não é adequado. O uso contínuo desses óleos causam diversos e sérios problemas de operação de curto e longo prazos nos motores, geralmente associados à alta viscosidade do óleo vegetal em relação ao diesel, mas também ao baixo índice de cetano e polimerização desse óleo. Essas diferenças podem acarretar na batida dos pistões e bielas, tão bem quanto pode prejudicar a queima dos combustíveis, por exemplo, (Balat & Balat, 2008). Além disso, uma vez esses óleos queimados nos motores, ocorre a formação de acroleína, uma substância cancerígena consequente da degradação do glicerol no óleo, inviabilizando o uso deles como combustíveis (Shahid et al., 2011).

O biodiesel é considerado o melhor biocombustível substituto para o diesel de petróleo devido suas possibilidades de pleno uso em motores diesel, seja na forma pura ou ainda em misturas (Narashimharao et al., 2007, Leung et al., 2010, Naik et al., 2010). Isso é possível devido suas similaridades de peso molecular, viscosidade e gravidade específica em comparação com o diesel de petróleo (Shahid et al., 2011). O biodiesel é uma mistura de ésteres monoalquílicos com extensa cadeia de ácidos graxos (Figura 1) que para sua síntese requer a transformação de óleos e gorduras através de reações químicas.



**Figura 1 – Estrutura molecular do biodiesel.**

Também o biodiesel se destaca em relação ao diesel por possuir maior eficiência de combustão, maior número de cetano, por ser biodegradável, por conter menor concentração de enxofre, de compostos aromáticos, de matéria particulada nos produtos de combustão (Leung et al., 2010) e de emitir menores concentrações de CO

e CO<sub>2</sub> na sua queima (Shahid et al., 2011), embora o incremento ou diminuição de espécies de NO<sub>x</sub> durante a queima do biodiesel em relação ao diesel não é um consenso (Leung et al., 2010; Shahid et al., 2011).

Devido às vantagens apresentadas pelo biodiesel, o Brasil estipula quotas de aumento de mistura do biodiesel junto ao diesel de petróleo nos automóveis junto ao Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB). Em 2008, os níveis de mistura do biodiesel junto ao diesel de petróleo chegou ao patamar de 3% (B3). Em 2010 houve o aumento dos níveis de mistura para 5% (B5). O Brasil é um dos países de política mais avançada em biocombustíveis, quando já na década de 1970 utilizava do álcool de cana de açúcar como combustível para veículos automotores (Mota et al., 2009). Isso alavancou o programa de biocombustíveis mais eficiente do mundo.

Sabidas as vantagens do biodiesel que justificam seu uso, é importante entender como se dá a sua síntese. Pela rota sintética empregada atualmente para produzir biodiesel na indústria, é gerado além do biodiesel, um coproduto: o glicerol cuja escalada da sua produção é marcada por preocupações.

O glicerol é denominado propano-1,2,3-triol pela IUPAC, mas também é conhecido por nomes comerciais: glicerina, 1,2,3-propanetriol, 1,2,3-trihidroxipropano, gliceritol, ou álcool glicílico (da Silva et al., 2009).

O glicerol é gerado pelos processos de sínteses químicas industriais a partir do gás propeno, mas também durante a transesterificação e esterificação dos óleos. De todo o biodiesel produzido na reação, cerca de 10% do volume gerado compreende ao glicerol (Mota et al., 2009). Uma das questões emergentes na área do biodiesel é a constante desvalorização desse coproduto. Uma vez que o aumento da produção de biodiesel tem sido verificado, certamente haverá aumento de produção de glicerol. Desde o ano 2000, o aumento global de produção do biodiesel na Europa gira em torno de 28% ao ano, além de ser esperado que a produção dos Estados Unidos triplique para os próximos anos, seguindo uma tendência global de aumento. Logo todo o acréscimo da produção desse combustível alternativo refletirá na ampliação da oferta de glicerol no mercado (Rahmat et al., 2010).

Devido ao avanço da produção de glicerol não acompanhar o aumento na demanda por ele, os preços pagos pelo glicerol caem. Esse coproduto desvalorizado, então, pode desfavorecer a viabilidade econômica da cadeia de produção do biodiesel (Rahmat et al., 2010). Isso porque o custeio parcial da produção do combustível alternativo poderia vir da comercialização do coproduto.

Deve se levar em consideração também que o glicerol produzido no processo de formação do biodiesel, também chamado de glicerina loira, necessita passar por um procedimento oneroso de purificação para atingir a qualidade do álcool necessário para uso industrial e de grande aplicação em vários outros setores (Coombs, 2007). Porém a necessidade da existência desse artifício acaba desfavorecendo a cadeia do biodiesel novamente, por inserir mais um custo na cadeia de produção (Rahmat et al., 2010; Mota et al., 2009).

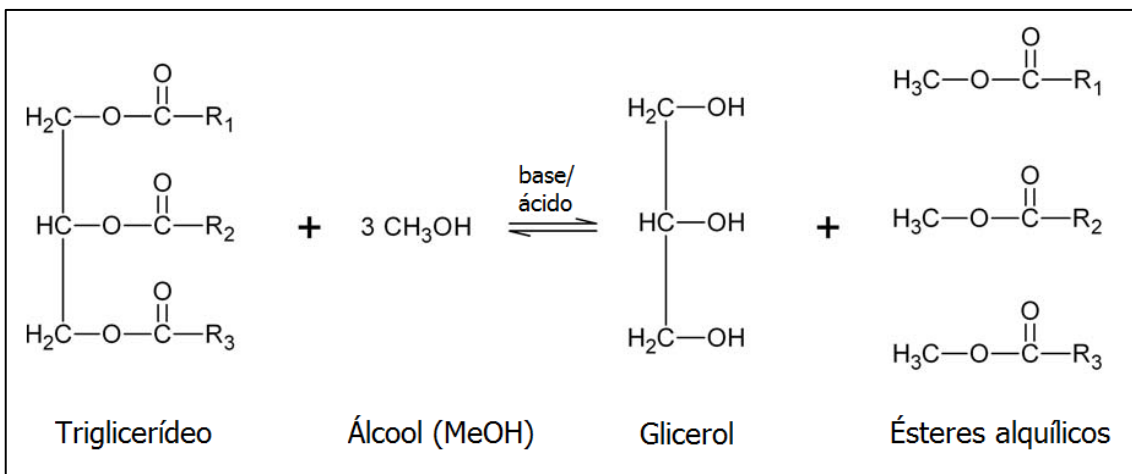
As projeções para o Brasil, depois de implantado o B5, apontam um excedente de 220 mil toneladas anuais de glicerol (Mota et al., 2009). Para o mundo o volume de glicerol proveniente do biodiesel pode chegar a um valor em torno de 7,5 bilhões de litros ainda no ano de 2012 (Coombs, 2007).

Para contornar o problema do excesso de produção de glicerol, várias têm sido as estratégias de aproveitamento e utilização desse álcool desenvolvidas atualmente. Algumas rotas sintéticas vislumbram a produção de acetais através da reação do glicerol com aldeídos e cetonas para aplicação do produto como aditivo para combustíveis, mas também para surfactantes, flavorizantes e para uso na medicina. Outra proposta é a formação de éteres a partir do glicerol para uso como aditivo de combustíveis e solventes. Alternativamente podem-se produzir surfactantes a partir da produção de ésteres de glicerol com reações seletivas. Também tem se pretendido promover a desidratação do glicerol para formar acroleína e ácido acrílico para produção de polímeros muito absorventes com usos os mais diversos, mas também para produção do aminoácido metionina. Outro aproveitamento proposto parte da hidrogenólise do glicerol formando o 1,2, o 1,3 propanodiol, ou ainda o propeno. O primeiro produto tem propriedades anticongelantes enquanto o segundo deles pode ser empregado na produção de fibras poliésteres. A oxidação do glicerol pode produzir muitos compostos distintos como a dihidroxiacetona, ácido glicérico, ácido tartrônico, ácido mesoxálico, ácido hidróxi-pirúvico com aplicações as mais diversas. Além disso, pode-se produzir gás de síntese para reações de Fischer-Tropsch através do emprego do glicerol e HCl com Platina como catalisador em condições específicas (Mota et al., 2009). Outras substâncias podem ser produzidas como ácido docosaheptaenóico ( $\omega-3$ ), glicerol carbonato, dicloropropanol, butanol, etanol, hidrogênio, ácido succínico, bioplásticos, etc., partindo do glicerol. (Rahmat et al., 2010; Coombs, 2007).

Outra fonte de utilização para o glicerol é a aplicação da sua forma bruta, não purificada (glicerina loira), como fonte de carbono para o metabolismo de

microrganismos convertendo-o em outros produtos de valor agregado. Essa utilização é apoiada no princípio de que os valores associados ao transporte do glicerol não purificado para outras plantas que depuram a substância em questão excedem o valor dele próprio. Várias moléculas de interesse biológico têm sido produzidas sob esse princípio como o ácido propiônico, butanol, 1,3 propanodiol, hidrogênio, dentre tantas outras substâncias (Coombs, 2007). Entretanto, o uso do glicerol na sua forma bruta também pode vislumbrar a síntese de enzimas (da Silva et al., 2009), nesse caso lipases para catálise do biodiesel, ajudando no fechamento do processo de produção, deixando-o economicamente e ecologicamente mais viável.

O biodiesel e glicerol são produzidos concomitantemente em uma mesma reação porque a transesterificação é a metodologia mais amplamente empregada na indústria para produção desse biocombustível (Figura 2) (Narashimharao et al., 2007). A reação de transesterificação foi descoberta como alternativa para promover a formação de biodiesel a partir das suas matérias primas em 1970 (Balat & Balat, 2008). Uma molécula de triglicerídeo tem suas ligações éster atacadas sob condições ácidas ou básicas por um álcool de cadeia curta como o metanol. O grupo alcóxidos substituem a ligação éster do triglicerídeo por outras, formando ésteres alquílicos de ácidos graxos.



**Figura 2 - Reação de transesterificação dos triglicerídeos pela rota alquílica.** Adaptado de (Babcock et al., 2008).

Atualmente, a transesterificação dos óleos, majoritariamente compostos por triglicerídeos, é feita em uma rota de catálise homogênea ácida ou básica produzindo biodiesel (Narashimharao et al., 2007). Para ela utilizam-se álcoois ou alcóxidos como possíveis nucleófilos (Figura 2). Mas outras formas de produção de biodiesel são possíveis além do uso direto dos óleos como: microemulsões, craqueamento térmico ou pirólise (Leung et al., 2010, Balat & Balat, 2008) e transesterificação por metanol supercrítico (Lee & Saka 2010).

As microemulsões consistem em emulsões isotrópicas e termodinamicamente estáveis de óleo, água, surfactante ou ainda um co-surfactante. Essa estratégia que visa à diminuição da viscosidade dos óleos vegetais provoca acúmulo de impregnações no sistema de injeção e aumento de depósitos de carbono no motor devido, sobretudo, à combustão incompleta dos óleos. A utilização de óleos microemulsionados como combustível também provoca o aumento da viscosidade do óleo de lubrificação do sistema.

A alternativa de produção através da pirólise consiste na aplicação de energia térmica com injeção de ar ou nitrogênio no sistema com triglicerídeos. Porém o processo gera altas concentrações de enxofre, água e sedimentos no motor, além do combustível possuir altos níveis de cinzas, resíduos carbonáceos e ponto de fusão não permitido (Fukuda et al., 2001).

A transesterificação é também denominada de metanólise devido à admissão de um álcool de cadeia curta na reação substituindo o álcool da ligação éster (Fukuda et al., 2001). Ela é a metodologia de produção de biodiesel preferida, sobretudo em condições básicas para quando o conteúdo de ácidos graxos livres é abaixo de 1%, pois ela ocorre com maior velocidade e menor formação de sabões (Shahid et al., 2011). A estratégia catalítica homogênea enfrenta limitações de um modo geral, como: baixo rendimento de reação para álcoois de cadeia longa; problemas de corrosão em reatores que operam sob condições ácidas; reação secundária de saponificação em rota alcalina acarretando na dificuldade da separação do biodiesel e do glicerol; menor velocidade reacional; insensibilidade da rota ácida para ácidos graxos livres (Balat & Balat, 2008) e restrições com impurezas, como água (Leung et al., 2010). O uso excessivo de energia e o longo tempo dispendido com processos secundários na produção são problemas a serem considerados (Shahid et al., 2011). Também, o glicerol pode estar presente junto ao biodiesel quando não adequadamente purificado junto a essa rota de catálise. Na sua queima, pode ser gerado formaldeído ou acetaldeído que são tóxicos (Balat & Balat, 2008).

A transesterificação também pode ser feita através de estratégias empregando catalisadores heterogêneos ácidos e básicos. Entretanto, os catalisadores básicos heterogêneos ainda são sensíveis aos ácidos graxos livres no sistema gerando sabão. Eles também são susceptíveis ao problema de lixiviação durante o processo, podendo contaminar o biodiesel.

Os catalisadores ácidos heterogêneos enfrentam problemas para serem candidatos na substituição da catálise atual. Isso porque a síntese dos catalisadores

passa por complicados processos. Igualmente, devido a esses catalisadores requererem condições de alta razão molar de álcoois em relação aos óleos para a reação, seu uso se torna dificultoso por ser mais caro. Cabe ressaltar a dificuldade no emprego desses catalisadores por eles demandarem de altas temperaturas necessárias para a reação, tão bem quanto por apresentarem problemas relativos à sua lixiviação. Assim seu uso em substituição à catálise atual não é realidade (Lam et al., 2010).

Métodos como a transesterificação por fluido supercrítico se apresenta como outra forma de catálise para formar o biodiesel, que foi desenvolvida em 2001. (Kusdiana & Saka, 2001). Essa metodologia emprega o álcool da reação em condições de altíssimas pressões e temperaturas correspondentes ao de seu ponto crítico, no qual a substância pode transitar entre seus três estados físicos: líquido, sólido e gasoso. O fluido ao atingir esse ponto tem drasticamente alteradas as suas propriedades dielétricas, de viscosidade, gravidade específica, polaridade, dentre outras, favorecendo as reações químicas (Lee & Saka 2010). As vantagens do processo é que não é requerido catalisador para reação, mas também à lavagem dos produtos ou sua neutralização é desnecessária, além da água presente no meio reacional não produzir interferência no rendimento do método. Por outro lado, a alta energia a ser empregada no procedimento, se apresenta como sua principal e importante limitação (Shahid et al., 2011).

Por outro lado, outra técnica de melhoria reacional não catalítica como as de irradiação ultrassônica/micro-ondas ou cavitação acústica/hidrodinâmica têm trazido novas perspectivas para a transesterificação do biodiesel. Essas técnicas não catalíticas de transesterificação combinadas com metodologias catalíticas têm iminente potencial de aplicação. Independente do tipo de sonicação utilizada, dos catalisadores aplicados e matérias primas empregadas, os rendimentos reacionais são aumentados e os tempos das reações são diminuídos (Veljković et al., 2012).

### **Uso de lipases para a produção de biodiesel**

Alternativamente aos métodos já explicitados, a transesterificação dos óleos e gorduras para formação do biodiesel empregando as enzimas possui diversas vantagens, pois através de sua utilização não existe formação de sabão, não existem problemas relativos à purificação dos produtos da reação, não é requerida lavagem e sequer neutralização desses produtos, além disso, a reação pode acontecer em brandas temperaturas (Shahid et al., 2011). Ela do mesmo modo pode ser altamente



seletiva (Yu et al., 2009) e ser compatível com a qualidade de óleos no processo (Fjerbaek et al. 2009). Entretanto, seu desuso se justifica pelos motivos principais: tempo reacional maior requerido pelas enzimas procederem a catálise, o alto custo desses catalisadores, a baixa quantidade de enzimas que operam sob condições ótimas de especificidades catalíticas e a perda de atividade das mesmas. (Fjerbaek et al. 2009, Yu et al., 2009, Sharma et al., 2001).

A utilização das lipases para transesterificação é geralmente feita quando elas se encontram imobilizadas. Em geral empregam-se técnicas de imobilização de lipase por adsorção, ligação covalente, ligações cruzadas e encapsulamento delas, sendo a adsorção a técnica mais utilizada. Quanto aos suportes, existem os mais variados: resina acrílica, terra diatomácea, suportes sol-gel, glutaraldeído, dentre outros. O suporte mais empregado é a malha têxtil. (Tan et al., 2010)

Recentemente lipases imobilizadas combinadas a técnicas de ultrasonicação e vibração foram utilizadas em um sistema químico otimizado em específico para promoverem transesterificação (Yu et al., 2009). Foi observado alto rendimento de reação de 96% em 4 horas de reação com cinco ciclos de operação, indicando potencial de aplicação da sonicação combinada com catálise. Porém, não existem muitos estudos sobre o assunto (Fiametti et al., 2010).

Outro trabalho interessante envolveu a imobilização da lipase de *Candida rugosa* em uma malha têxtil em um reator que operava com 1/3 de metanol em relação ao éter de petróleo, solvente da reação. A 10% de água e 40°C, utilizando também de óleo de salada como reagente, atingiu-se 96% de rendimento. A estabilidade de enzima foi estimada em 500 h nesse sistema (Nie et al, 2006).

O domínio tecnológico das enzimas lipases pode impactar em um mercado de bilhões de dólares em áreas, não somente na indústria de biocombustíveis, mas também na indústria de detergentes; de materiais poliméricos; de química fina; de medicamentos enantiopuros; na indústria de alimentos (Jaeger & Eggert, 2002); de tecidos; de couro; cosmética; de papel e no tratamento de efluentes. Devido a sua versatilidade essas enzimas são tidas como as mais importantes para biocatálise em biotecnologia (Reis et al., 2009) e seu uso no mercado é datado desde 1979. Estima-se que o mercado de lipases pode se igualar aos das peptidases, cuja importância do último grupo corresponde de 25–40% do mercado de enzimas industriais atualmente (Bon et al., 2008)

Lipases (triacil glicerol éster hidrolases, EC 3.1.1.3) são enzimas conhecidas como carboxilesterases que catalisam reações químicas com acilgliceróis a partir de uma estrutura de trioleilglicerol, liberando mono ou digliceróis, ácidos graxos e glicerol (Jaeger & Eggert, 2002). Contudo essas biomoléculas podem também catalisar reações inversas na ausência de água – esterificação e as distintas reações de transesterificação (Bon et al., 2008). Em sistemas não aquosos é reportada excelente atividade catalítica e estabilidade dessas enzimas, facilitando as reações de transesterificação dos triacilgliceróis e esterificação dos ácidos graxos livres necessárias para a produção do biodiesel (Tan et al., 2010).

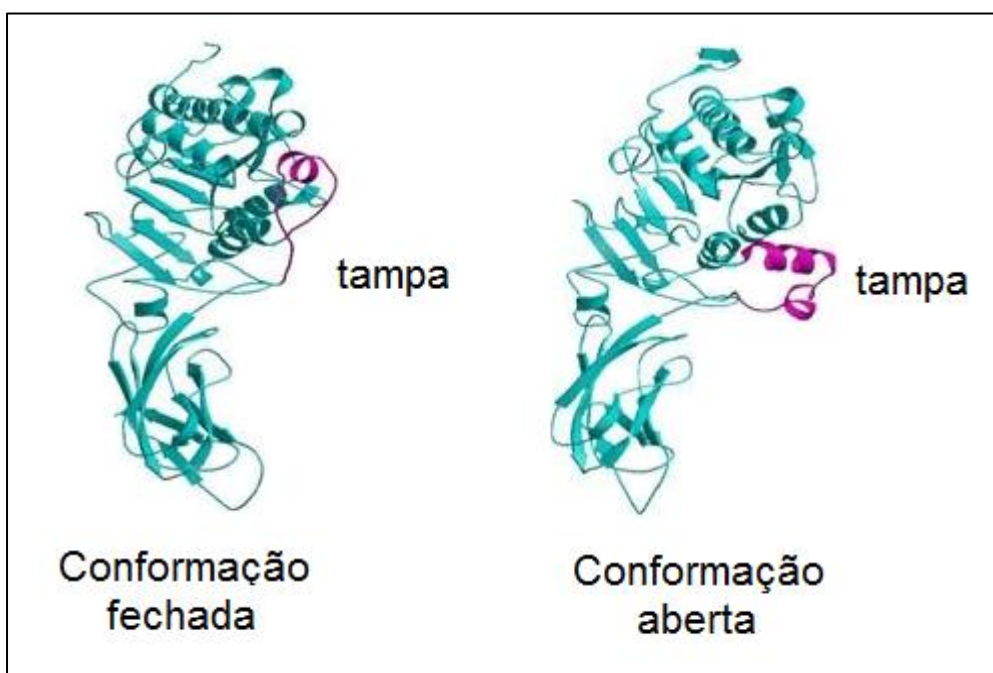
Essas enzimas lipolíticas podem também ser classificadas como serino hidrolases (Reis et al., 2009). Juntamente com as esterases e peptidases, as lipases são membros característicos da família das  $\alpha/\beta$  hidrolases, compartilhando similaridades estruturais e funcionais entre suas moléculas. (Ericksson et al., 2008; Bon et al., 2008).

As lipases também são conhecidas devido as suas características bastantes interessantes como a região, quimio e estereoseletividades. A maioria das lipases não requer cofatores para a catálise (Jaeger & Eggert, 2002), sendo também bem conhecidas através de suas estruturas cristalográficas disponíveis (Schrag et al., 1991). Além disso, elas podem ser produzidas em grandes quantidades por microrganismos (Jaeger & Eggert, 2002).

Também é característica de muitas lipases uma  $\alpha$ -hélice que protege o sítio ativo da enzima quando ela não está em região interfacial, fechando-a. Denomina-se essa estrutura de tampa (Figura 3). Ela esconde o sítio ativo da enzima que é estreito em alguns casos. Na conformação fechada existe superfície de contato complementar às regiões de acesso ao nucleófilo (Bon et al., 2008).

Essas enzimas em geral são solúveis, com superfícies mais hidrofóbicas do que a região contendo a tampa (Bon et al., 2008). Porém, as lipases atuam nas interfaces entre as fases aquosas e oleosas e mostram a mais alta atividade quando a concentração do substrato oleoso é suficiente para formar micelas ou gotas em emulsão (Reis et al., 2009).

Quando a enzima está na interface óleo/água, a porção da tampa se move, expondo a fenda contendo o sítio ativo (Meier et al., 2007). A esse fenômeno denomina-se ativação interfacial. Mas ele não se aplica para todas as lipases. Esse fenômeno ocorre, pois a lipase tem uma área mais hidrofóbica ao redor do sítio catalítico que direciona a mesma para manter contato com a camada lipídica, podendo a enzima estar então adsorvida junto a essa camada. Esse posicionamento induz a modificações conformacionais na enzima, culminando com o reposicionamento da tampa da lipase, ativando-a (Bon et al., 2008).



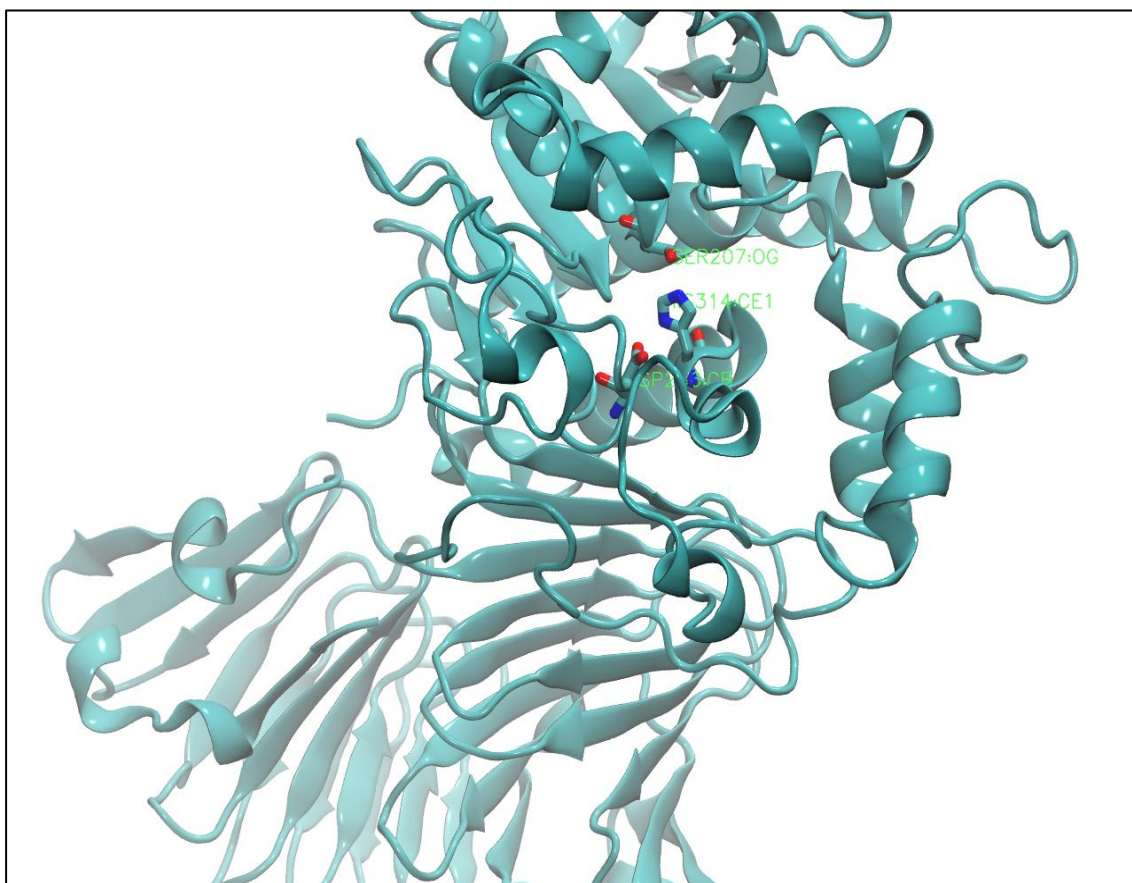
**Figura 3 - Posicionamento da estrutura secundária que compõe a tampa na ativação da lipase.** Modificado de (<http://www.icp.csic.es/biocatalisis/web3/Palomoweb/uusframe/lipases.html>), acessado em 17/06/2012.

Sabe-se da necessidade de haver alguma quantidade de água no sistema mesmo que o solvente do sistema seja apolar para que a proteína catalítica tenha a capacidade em atuar nas interfaces. Caso não houver uma quantidade mínima de água, a estabilidade e a especificidade da enzima ficam prejudicadas. Por exemplo, em um ambiente com excesso de água ao invés da enzima promover a transesterificação dos óleos e gerar biodiesel a reação predominante é a hidrólise (Tan et al., 2010).

A sua capacidade de ativação interfacial é uma das características mais marcantes do grupo que possibilita distinguir as lipases das esterases (Ericksson et al., 2008). Mas existem divergências na interpretação quanto à exclusividade dessa característica para classificar o grupo (Bon et al., 2008). Por outro lado, sabe-se que a

complexidade intrínseca para se elucidar os fenômenos nesses microambientes químicos de interface atrasou o entendimento sobre a regulação dessas enzimas (Reis et al., 2009).

Atualmente os estudos para compreensão das proteínas lipolíticas têm envolvido a caracterização estrutural, o conhecimento sobre mecanismo de ação, tão bem quanto à melhoria da sua seletividade através de técnicas como biofísica molecular, cristalografia, modelagem molecular e mapeamento de substratos. Mas os estudos também contemplam a clonagem e expressão de lipases para produção em larga escala acoplada a mutagênese sítio-dirigida ou até aleatória através de *high-throughput screening* para alcançar melhorias na produção de enzimas, tão bem quanto nas atividades ou estabilidades delas (Bon et al., 2008).

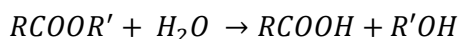


**Figura 4 - Estrutura tridimensional da lipase de *Serratia marcescens* (PDB 2qua).** Em destaque tríade catalítica com os resíduos de Ser, Asp e His na fenda oxianiónica. Adaptado de Meier et al. 2007.

Com o auxílio das estruturas cristalográficas das lipases, por exemplo, foi possível confirmar as predições com respeito à tríade catalítica dessa importante enzima composta pela sequência G – X<sub>1</sub> – S – X<sub>2</sub> – G (Figura 4), onde G = Glicina; S = Serina; X<sub>1</sub> = Histidina e X<sub>2</sub> = aspartato ou glutamato (Saxena et al.,2003). Essa estrutura também encontrada nas serino–proteases. A partir da elucidação estrutural

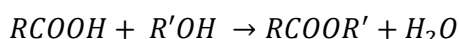
da enzima também foi possível compreender o seu mecanismo catalítico (Reis et al., 2009).

Segundo (Reis et al., 2009), esse grupo de enzimas lipolíticas podem catalisar reações agrupadas em dois conjuntos: de hidrólise,

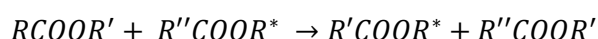


e síntese. Porém esse último grupo de reações compreende àquelas de:

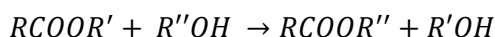
esterificação,



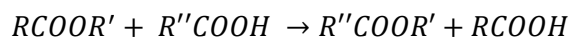
interesterificação,



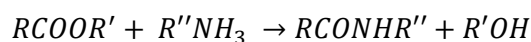
Alcoólise (transesterificação),



e acidólise,

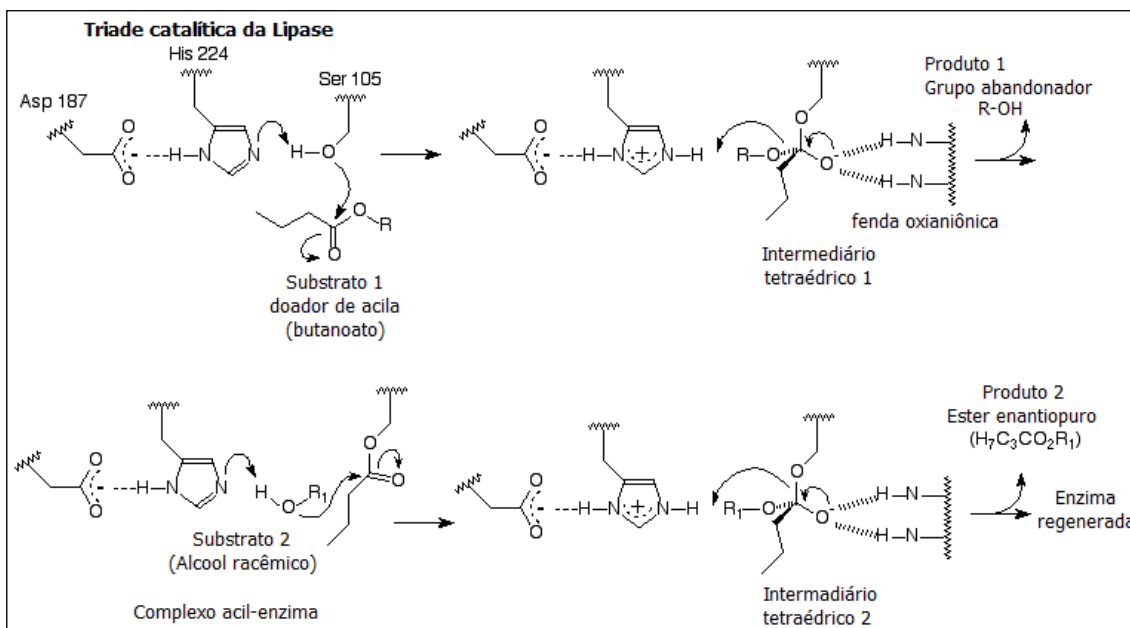


dos mesmos acilgliceróis, sendo que as últimas três reações são entendidas como transesterificação. Também é reportada a catálise da reação de aminólise mediada por lipases (Vaklu, 2006; Singh, 2012):



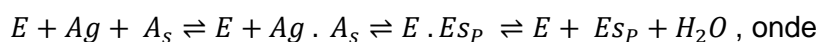
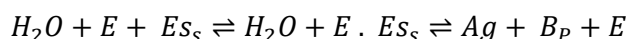
Considera-se que para sua atuação, inicialmente a serina é desprotonada através de um ataque nucleofílico do par de elétrons não ligantes da histidina que tem sua carga estabilizada pelo resíduo de aspartato ou glutamato no sítio ativo (Figura 5). A desprotonação da serina permite um novo ataque nucleofílico no carbono da ligação éster da espécie doadora de grupos acila. Um intermediário tetraédrico é formado e estabilizado pela fenda oxaniônica. Esse intermediário instável se desfaz culminando com a saída de um grupo abandonador álcool. Uma nova etapa se inicia com a entrada de um álcool racêmico cujo hidrogênio desse grupo funcional é atacado pelo par de elétrons não ligantes da histidina. O aumento da nucleofilicidade do oxigênio permite o ataque imediato do carbono da ligação éster junto à serina já substituída.

Esse ataque gera um novo intermediário tetraédrico que se desfaz liberando o éster (biodiesel), regenerando a enzima (Reis et al., 2009).



**Figura 5 - Mecanismo geral da transesterificação por Lipase.** Modificado de (<http://www.nt.ntnu.no/users/thorleif/biocat/biocatalysis.html>). Acessado em 17/06/2012.

As lipases operam sobre uma ligação éster em um mecanismo de duas etapas em uma reação de transesterificação. Na primeira delas ocorre a hidrólise da ligação éster seguida da liberação de uma espécie álcool. Após essa etapa ocorre uma esterificação com um segundo substrato como representa as equações (Fjerbaek et al. 2009):



- $E$  = Enzima livre;
- $Es_s$  = Substrato éster;
- $B_p$  = Produto com radical álcool;
- $Ag$  = Ácido graxo;
- $A_s$  = Álcool substrato;
- $Es_p$  = Ésteres graxos alquílicos.

O modelo cinético que melhor se ajusta a uma transesterificação de lipase é o ping-pong bi bi, mas o modelo de Michaelis-Mentem pode descrever a cinética dessas enzimas satisfatoriamente no estado estacionário (Fjerbaek et al. 2009).

As lipases podem ser encontradas tanto em meio extracelular quanto intracelular. Porém o uso dessas enzimas candidatas para a transesterificação dos óleos para produção de biodiesel é feito *a posteriori* do cultivo, purificação e

imobilização delas (Fukuda et al., 2001). As variáveis que mais influenciam a produção das lipases extracelulares são a temperatura, pH e oxigênio dissolvido, além da fonte de carbono como triacilgliceróis, ácidos graxos, ésteres hidrolisáveis, tween, sais biliares e glicerol. As fontes de nitrogênio e micronutrientes essenciais precisam ser cuidadosamente estudadas e em geral os requerimentos nutricionais têm sido preenchidos por componentes complexos como peptona, extrato de malte ou resíduos industriais (Treichel et al., 2009).

O uso de enzimas intracelulares para transesterificação não se justifica principalmente devido aos procedimentos de purificação complexos e caros pelos quais elas devem passar, além do que as enzimas se mostram instáveis para as condições reacionais. Isso tem aberto uma fronteira de pesquisa do uso das células para a catálise uma vez que elas contêm lipases apenas intracelulares (Fukuda et al., 2001).

As lipases são enzimas produzidas por quase todos os organismos vivos como em bactérias, fungos, leveduras e actinomicetos. As enzimas lipases podem ser encontradas junto a microrganismos que ocupam habitats como de resíduos industriais, fábrica de processamento de óleos, fazendas leiteiras, solos contaminadas com óleos, sementes oleosas, alimentos em decomposição, pilhas de compostagem, fontes termais, dentre outros (Sharma et al., 2001).

Não somente as lipases podem ser produzidas por microrganismos e serem extra ou intracelulares, mas também essas enzimas quando sintetizadas por algum microrganismo podem existir em formas múltiplas. Percebe-se de um modo geral a produção de mais uma forma de lipase pelos micróbios, mas é possível existirem mais isoformas da enzima que podem ser inclusive interconvertíveis. Além disso, a produção das diferentes lipases é dependente da fonte nutricional que é disponibilizada para os microrganismos. Essas isoformas podem ter algumas similaridades, porém elas podem ter distintas massas moleculares ou especificidades enzimáticas junto aos seus substratos (Sharma et al., 2001).

As lipases de microrganismos têm merecido atenção especial devido as suas amplas estabilidades, seletividades e especificidades de substratos (Treichel et al., 2009). Mas também por apresentarem alta velocidade de síntese, alto rendimento de conversão, maior simplicidade da manipulação ambiental e genética de sua capacidade produtiva. (Bon et al., 2008). Devido essas propriedades dessas proteínas catalíticas microbianas, elas têm sido consideradas como as únicas comercialmente significantes para produção de biodiesel (Sharma et al., 2001).

Entre os fungos filamentosos, os gêneros mais comuns de organismos produtores de lipase são *Rhizopus* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Geotrichum* sp., *Mucor* sp. e *Rhizomucor* sp (Treichel et al., 2009). Entre as leveduras, destacam-se as espécies dos gêneros *Candida* sp., *Yarrowia* sp., e *Pichia* sp., sobressaindo-se o primeiro gênero de levedura citado como o de maior potencial produtor (Treichel et al., 2009). *Candida* sp., especialmente, é apontado como o gênero com maior número de trabalhos na literatura (Salihu et al., 2012). Dentre os gêneros bacterianos, citam-se *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Burkholderia* sp. e *Staphylococcus* sp. como clados típicos de organismos produtores da lipase (Treichel et al., 2009).

A produção de lipases por microrganismos como fungos é grandemente determinada por variáveis nutricionais e físico-químicas como temperatura, pH, fontes de carbono e nitrogênio e presença de lipídeos, sais inorgânicos, agitação e concentração de oxigênio dissolvido, variáveis compartilhadas na influência da produção com leveduras (Singh et al., 2012). A metodologia mais utilizada para se sintetizar a enzima por microrganismos de modo geral é a fermentação submersa, aparecendo os métodos de fermentação em estado sólido em segunda opção em frequência de método de escolha (Sharma et al., 2001).

Sabe-se que os indutores extracelulares são responsáveis por ativar a produção das lipases, em geral são substâncias com longa cadeia carbônica na sua estrutura química: óleos, gorduras animais, tween, etc, que também são fontes de carbono para os microrganismos. Essas moléculas são assimiladas e estocadas quando, depois, a lipase é produzida e excretada para a interface óleo-água no meio extracelular. A modulação da produção de lipase é feita muitas vezes pela concentração do indutor no meio extracelular (Salihu et al., 2012).

Com relação às fontes de carbono, em geral os lipídeos, ésteres hidrolisáveis, sais biliares e glicerol induzem a produção de lipase para os microrganismos que a fazem (Singh et al., 2012). A presença de óleos ou de substâncias com longa cadeia carbônica é quase sempre necessária para promover a produção da enzima. Quando a fonte oleosa não se encontra presente no meio de cultura de cultivo do microrganismo a síntese da lipase é sensivelmente decrescida para várias espécies e meios testados (Sharma et al., 2001), muito embora a produção basal das mesmas seja detectável em muitos microrganismos. Sabe-se que, independente do modo de produção, induzida ou não, ela acontece determinada pelo mesmo gene (Salihu et al., 2012).



Em relação às fontes de nitrogênio que mais influenciam o cultivo de microrganismos para produção dessa proteína lipolítica, nota-se a utilização recorrente de peptona (1,0 – 5,0%) e (ou) extrato de levedura (0,1 – 1,0%) nos meios de cultura. Em geral elas são mais efetivas para produzir lipase quando se comparam elas com fontes inorgânicas de nitrogênio (Sharma et al., 2001).

Para fungos, os mais diversos resíduos agroindustriais têm sido utilizados também em procedimentos de cultivo para produção da enzima como alternativa nutricional para os organismos e como forma de utilização de um coproduto de baixo valor agregado (Singh et al., 2012; Salihu et al., 2012). Conhece-se além do glicerol, o uso de resíduos para a nutrição microbiana como a milhocina, farelo de soja, de trigo o bagaço de cana, tortas de babaçu, torta da semente do óleo do Níger, efluentes industriais, como tantos outros (Sharma et al., 2001; Salihu et al., 2012).

As diferentes fontes de íons metálicos também podem produzir efeitos significativos para incentivar a produção de lipase por diversos microrganismos quando comparadas entre si. Na revisão de (Sharma et al., 2001), foi percebido consenso em muitos dos trabalhos reportados pelo autor para o aumento da produção de lipase quando havia  $Mg^{2+}$  no meio de cultura. Também, porém com menor frequência, aparecia, a influência da presença de  $Ca^{2+}$  na cultura para aumentar a produção.

Diferentes técnicas de produção de lipase têm sido desenvolvidas para melhorar a produção da enzima. Dentre as mais comuns encontra-se a fermentação em estado sólido, que distribui os componentes nutricionais para o crescimento do microrganismo em meio gelatinoso e por outro lado a fermentação submersa cuja técnica os nutrientes estão dissolvidos. 90% de toda enzima é produzida por fermentação submersa uma vez que a técnica já é bem padronizada para produção de lipases. Por outro lado, ainda que a técnica de fermentação em estado sólido é adequada para países que possuem elevada quantidade de resíduos de biomassa ou agropecuários, a técnica de produção é mais adequada para fungos, e também tem problemas associados à manutenção de variáveis importantes fixas no processo de produção de lipase como pH, temperatura, aeração, dentre outros (Salihu et al., 2012).

Analisando os processos de produção de enzimas por microrganismos disponíveis industrialmente, nota-se que estratégias como a de batelada, batelada alimentada e processo contínuo são as mais empregadas (Singh et al., 2012) cujas táticas poderiam ser aplicadas para a produção da enzima também em leveduras.

### ***Delineamento experimental***

Um dos recentes avanços na área de pesquisa em biocombustíveis tem sido o emprego de delineamentos experimentais (DOE – Design of Experiments) para analisar a influência de variáveis em uma resposta desejada. Esses delineamentos melhoram o processo de busca de melhores condições de reação para os fenômenos complexos como são em geral aqueles relacionados aos biocombustíveis, que envolvem a melhoria de uma resposta atrelada a várias variáveis.

O delineamento experimental tem sido amplamente utilizado para aprimorar a produção de lipase por microrganismos quando variando os requisitos nutricionais presentes no meio de cultura que os abriga (Salihu et al., 2012) através da elaboração e teste das condições do meio de cultura otimizado (Treichel et al., 2009). Em geral a melhor condição de um microrganismo para a produção de lipase é alcançada através da elaboração e teste das condições do meio de cultura otimizado (Treichel et al., 2009).

Necessariamente para a aplicação dessa estratégia experimental essas variáveis testados têm de ser independentes. Quando elas produzem alterações na resposta devido à sua presença, isso é detectado pelo efeito principal, que é a média da diferença dos efeitos produzidos pela variação entre seus níveis no delineamento (Montgomery, 1991).

Entretanto é possível ainda por essa técnica experimental a extração de informações a respeito do efeito que a combinação entre as variáveis testadas exerce na resposta objetivada (Veljković et al., 2012; Treichel et al., 2009; Rodrigues & Lemma, 2009).

Conhece-se o efeito da combinação das variáveis estudadas, por sua vez, pela rejeição do teste t de Student das diferenças das respostas obtidas frente duas variáveis sobre a média delas. Denomina-se a esse efeito interação entre variáveis (Cochran & Cox, 1957). Assim, quando ambas as variáveis estiverem presentes em um delineamento, mesmo eles sendo independentes, seus efeitos podem se somar mutuamente ou podem ser diminuídos pela presença de ambos. Na medida em que uma terceira variável é adicionada no delineamento, pode ser acessada a informação não só da combinação de duas a duas delas na resposta, mas pela combinação das três conjuntamente (Montgomery, 1991). Essa informação tem enorme relevância prática.

A adoção de delineamentos experimentais traz benefícios de redução de custo, diminuição de tempo gasto e diminuindo a ineficiência da busca pela melhor condição. Essa metodologia de delineamentos contrapõe a metodologia de se encontrar a condição ótima testando um fator por vez, fixando os demais. Isso porque são testadas várias condições ao mesmo tempo, com menor número de experimentos (Veljković et al., 2012; Treichel et al., 2009; Rodrigues & Lemma, 2009). As vantagens dessa metodologia em relação à metodologia tradicional de pesquisa também se explica porque, sabendo da independência entre as variáveis, a quantidade de experimentos necessários no planejamento será aquela tão somente suficiente para provar o efeito dos níveis em cada variável estudada. Ou seja, caso buscarmos o efeito de uma variável  $n$  na resposta sendo que ela necessita do mesmo número  $x$  de testes para confirmação do seu efeito na resposta, é possível comprovar todas as influências para outras variáveis  $o$ ,  $p$ ,  $q$ , nesse mesmo planejamento independente do número  $n$  de variáveis com um menor número de testes (Cochran & Cox, 1957, Box et al., 2005).

Outra vantagem dos delineamentos experimentais é que a precisão do experimento fatorial é a mesma quando se compara um estudo isolado, quando se analisa apenas um fator para entender o seu efeito na resposta isoladamente, ou quando se investiga a influência de diversas variáveis na variável resposta. Portanto o número de experimentos necessários para a busca dos efeitos cai drasticamente enquanto permanece constante a confiabilidade dos resultados. Porém o erro experimental aumenta quão maior é o planejamento tão bem quanto à dificuldade de executar simultaneamente grande número de experimentos (Cochran & Cox, 1957).

Pelos delineamentos experimentais podem ser construídos blocos de teste com diferentes finalidades: para detectar a influência de cada variável estudada sobre a resposta pretendida; para estudar o efeito da combinação das variáveis na resposta e ainda para experiências em que recomendações devem ser aplicadas sobre uma vasta gama de variáveis (Cochran & Cox, 1957).

A primeira estratégia experimental se justifica quando a quantidade de variáveis estudadas é muito grande. Sendo assim, utiliza-se de um primeiro delineamento experimental para determinar a influência das variáveis na resposta final, chama-se isso de triagem de variáveis. Realizam-se testes em planejamentos como fatorial fracionado ou completo, Plackett e Burman ou fatorial de níveis mistos nessa fase para somente depois, em um novo delineamento, analisar os efeitos de interação entre as variáveis na resposta pretendida. Em geral se recorre ao delineamento

composto central rotacional – DCCR ou à metodologia de Box – Behnken (Rodrigues & lemma, 2009; Contesini et al., 2009; NIST/SEMATECH, 2003).

Quando se tratando da primeira estratégia pode se tomar também uma fração da região amostral para indicação ou predição da região do ótimo para depois serem realizados testes a região próxima do ótimo predito, ao invés de se testar toda a região amostral. Ou seja, é realizado um primeiro planejamento para determinar as variáveis envolvidas no processo e ser predita a região do máximo, e depois, na vizinhança do máximo estimado se faz um delineamento especial (Cochran & Cox, 1957). Quando são realizados experimentos entre uma primeira região amostrada num delineamento inicial em comparação com a região do ótimo, denomina-se deslocamento ascendente (Box et al., 2005; Box, 1992).

Em geral, para serem realizados delineamentos com até oito variáveis em um mesmo estudo, utiliza-se da estratégia de fatorial fracionado ou fatorial completo para tanto. A partir desse número recomenda-se o uso do delineamento de Plackett & Burmann devido a sua flexibilidade no número de ensaios disponíveis para aperfeiçoar a resposta pretendida, em geral requisitando um número menor deles (Rodrigues & lemma, 2009; Contesini et al., 2009). A descrição de um planejamento fatorial é representada por uma notação exponencial  $X^y$ , tal que  $X$  corresponde à quantidade de níveis de cada fator e  $y$  representa a quantidade de variáveis de  $X$  níveis no delineamento.

Frequentemente, grande parte dos trabalhos objetiva a condição que aperfeiçoa uma resposta ao invés de apenas compreender o processo relacionado com as variáveis, mesmo quando a quantidade de experimentos necessários é grande. Para contornar o problema de grande tempo e materiais serem requeridos nesse processo, pode-se fazer apenas uma replicata para cada ponto no delineamento (Cochran & Cox, 1957).

Entretanto, para algumas condições especiais quando algumas variáveis que possuem três níveis combinam com outras contendo dois níveis em um mesmo delineamento, deve ser usada uma estratégia experimental alcunhada fatorial de níveis mistos, também conhecida por delineamento Taguchi. Esses delineamentos são determinados pela seguinte notação:

$$L_x (a^m + b^n), \text{ tal que:}$$

$L$  = notação para testes Taguchi;

$x$  = número de ensaios do delineamento;

a = níveis do primeiro fator no delineamento;  
b = níveis do segundo fator no delineamento;  
m = quantidade de variáveis com a níveis no delineamento;  
n = quantidade de variáveis com b níveis no delineamento.

ou seja, para um experimento com cinco variáveis com dois níveis e duas variáveis com três níveis e dez testes, teremos L10 ( $2^5 + 3^2$ ) (NIST/SEMATECH, 2003).

Poucos trabalhos, entretanto, têm utilizado da estratégia de delineamento experimental fatorial de níveis mistos na produção de lipase através microrganismos em cultura. A vantagem do delineamento de níveis mistos é que ele determina as variáveis mais predominantes no efeito buscado enquanto não acusa como determinantes outras menos influentes. Ainda, a razão sinal-ruído pode ser utilizada para aperfeiçoar o processo e reduzir a variabilidade dos sinais obtidos. Ou seja, pela técnica é possível se obter resultados mais consistentes do que resultados mais elevados, ou mais otimizados. Devido à variação experimental dos dados era melhor se obter valores que se mantinham em média altos do que outros que eram altos por hora, mas pela variação processual, não se mantinham (SIX SIGMA GLOSSARY, 2009)

Porém a desvantagem da técnica é que ela não acessa os efeitos de interação entre as variáveis muito bem. Para detectar esses efeitos, é necessário ser utilizada de outra técnica (Mei et al., 2002; Neto, 2003).

Vários trabalhos utilizam de delineamentos para melhorar a produção de produtos biotecnológicos, incluindo lipases (Kalil et al., 2000; Gupta et al., 2006; Wolski et al., 2008; Chennupati et al., 2009; Contesini et al., 2009; Volpato, 2009; Kumar et al., 2011). Em geral empregam-se metodologias de fatorial fracionado/completo ou Plackett-Burman para seleção de variáveis ( $2^n$ ), seguido de um delineamento composto central rotacional - DCCR para aquelas selecionadas. Cabe salientar, inclusive que durante a seleção das variáveis, os autores divergem na utilização da metodologia quando estipulam os níveis inferiores para serem aplicados no delineamento. Enquanto alguns deles estipulam como o nível mais baixo de algum fator no delineamento como sendo a ausência do mesmo (Gupta et al., 2006; Volpato, 2009; Wolski et al., 2008), outros não constroem o delineamento a partir desse pressuposto, determinando um valor que pode ser baixo, porém não nulo (Contesini et al., 2009; Kumar et al., 2011; Chennupati et al., 2009; Kalil et al., 2000).

Foi executado um planejamento do tipo L9 ( $2^2 + 3^2$ ) com 4 variáveis resultando na eliminação da glicose do meio de cultura (Korbekandi et al., 2008). Nessa

estratégia estipulou-se o nível inferior de cada variável com sua ausência e não se fez um DCCR em seguida. (Teng & Xu, 2008) promoveram a otimização de lipase intracelular com uma espécie de fungo utilizando 9 variáveis em um planejamento do tipo L18 ( $2^1 + 3^7$ ). Dos nutrientes testados, apenas 4 se mostraram significativos para otimizar a resposta de produção. Após a aplicação da metodologia de superfície de reposta e validação dos dados preditos, foi melhorada a produção em 120%. (Sabbaghian & Roostaazad, 2005) aplicaram a metodologia para 9 variáveis, porém a metodologia não fora aplicada combinando apenas variáveis com dois níveis em dois delineamentos sequenciais. Aplicaram-se dois delineamentos: um inicial L16 ( $2^{15}$ ) e um final L9 ( $3^4$ ), o que sugere se a melhor técnica para esse primeiro delineamento não seria um Placket-Burman devido a existência de maior número de variáveis nele e, no segundo estudo, um fatorial completo ou fracionado. (Heravi et al., 2008) utilizou a metodologia para sete variáveis em um delineamento L8 para variáveis com apenas dois níveis o que sugere o mesmo questionamento feito para o trabalho anterior.

### ***Moniliella spathulata* R25L270 como organismo produtor de lipases**

Ainda que a otimização de meios de cultura tenha uma utilidade crescente para a pesquisa em biotecnologia, essa técnica não substitui a busca por microrganismos produtores de enzimas para catalisar reações em atividades industriais. Isso inclusive tem mobilizado diversos grupos de pesquisa ao redor do mundo na busca desses catalisadores protéicos (Colen et al., 2006; Hou, C. T., 1997; Fregolente et al., 2009; Leonov, S. L., 2010). Muitos deles focam sua busca para organismos que produzem lipases termotolerantes visto que a taxa com que a reação ocorre dobra com um aumento de 10°C na temperatura (Sharma et al., 2001).

Várias pesquisas têm sido desenvolvidas no sentido de isolar microrganismos produtores destas enzimas, incluindo vários gêneros e espécies de bactérias, leveduras, actinomicetos e fungos. Microrganismos com potencial lipolítico têm sido encontrados nos mais diversos habitats, como resíduos industriais, indústrias de óleos vegetais, laticínios, solo contaminado com óleo, sementes de oleaginosas, alimentos em decomposição, pilhas de compostagem e fontes termais. Os principais gêneros incluem as leveduras *Candida* e *Torulopsis*, fungos filamentosos como *Rhizopus*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Geotrichum* e *Mucor* e bactérias como *Pseudomonas* e *Staphylococcus* (Reetz, 2002).

Um recente exemplo desse interesse foi o esforço para testar os isolados dos microrganismos com atividade lipolítica do requeijão do norte, também conhecido

como queijo de manteiga ou requeijão moreno nas regiões norte e nordeste do Brasil e no norte do estado de Minas Gerais quanto a produção de lipases (Dias, 2010).

O primeiro relato do isolamento da espécie *Moniliella spathulata* R25L270 ocorreu coligado a queijos, embora já fosse sabida a associação de organismos desse gênero com substratos gordurosos. Dos 233 isolados obtidos nesse trabalho (Viana, 2009), 189 foram estudados quanto à capacidade de produzir lipases (Dias, 2010). Os 43 isolados que confirmaram a produção da enzima foram novamente testados quanto à capacidade de biossíntese de lipase em meio líquido contendo óleo de oliva, totalizando 18 no final da prova. Um novo teste com essas espécies restantes foi feito para verificar a produção de lipases a partir de um meio líquido contendo glicerol. Das 18 espécies, apenas três apresentaram atividade enzimática sendo que a de melhor resultado foi a *Moniliella spathulata* R25L270 (Dias, 2010).

Recentemente, houve mudança na classificação desse microrganismo, que passou do gênero *Trichosporonoides* sp. para o gênero *Moniliella* sp. dadas as similaridades genéticas dos domínios D1 e D2 da maior subunidade do DNA ribossomal e também devido as características fenotípicas similares das espécies dos dois grupos (Rosa, 2009).

### **Purificação de enzimas lipases**

A etapa de purificação das lipases produzidas por um organismo qualquer é requerida em estudos de caracterização estrutural e físico-química de enzimas. Através do bom emprego da técnica e obtenção do extrato purificado é possível serem acessados dados sobre a determinação da sequência e estrutura tridimensional, tão bem quanto informações sobre a atividade e estabilidade desses catalisadores, auxiliando em uma compreensão mais ampla sobre os processos os quais a lipase opera (Saxena et al., 2003).

A maioria dos processos cromatográficos de lipases é compreendida por uma primeira etapa de remoção das células do meio de cultura, já que as lipases em sua maioria se mostram extracelulares, seguida de uma segunda etapa de concentração. Utiliza-se da precipitação em 80% dos casos como estratégia de concentração das proteínas. Desses casos, mais da metade fazem uso de sulfato de amônio como metodologia (Saxena et al., 2003).

Também para a purificação de lipase recorre-se ao uso de cromatografia de troca iônica em 67% dos casos, seguido de cromatografia de gel filtração (60%), afinidade (27%), interação hidrofóbica (18%) e adsorção (16%) (Saxena et al., 2003,

Saisubramanian et al., 2008). Contudo a cromatografia de afinidade pode ser usada para diminuir a quantidade de procedimentos necessários para a purificação (Sharma et al., 2001). Em geral os procedimentos cromatográficos de purificação de lipases proporcionam baixos rendimentos, consomem muito tempo e são complexos (Saxena et al., 2003). Valores menores de rendimento de purificação são possíveis.

Os trabalhos revisados por (Sharma et al., 2001) mostraram que esforços de purificação de lipases e caracterização das mesmas proporcionou conhecimento sobre as enzimas que mostravam pesos moleculares variando desde 5 até 65kDa. Percebeu-se que a maioria delas que tinham peso entre 25 e 45 kDa e verificou-se também que os aumentos das atividades específicas junto das metodologias empregadas variavam desde 37 até 1200 vezes para recuperar a enzima purificada. Muito embora menores aumentos das atividades específicas para obter uma lipase pura é possível (17,1 vezes) como mostra o trabalho de purificação para *Cryptococcus sp* (Kamini, 2000).

Estudos de caracterização de lipases são muito importantes visto que são esses que determinam as condições operacionais ideais para a enzima trabalhar. Sob o ponto de vista da cinética enzimática, sabe-se que a cada 10°C de temperatura reacional aumentada, dobra-se a velocidade da reação. Assim, enzimas com capacidades de operar em elevadas temperaturas são bastantes desejadas, pois converteriam mais rapidamente os reagentes.

Várias enzimas termoestáveis têm sido purificadas e estudadas. Nos estudos analisados por (Sharma et al., 2001) as lipases testadas a 75°C retiveram 50% das suas atividades entre 15 minutos e 8 horas em diferentes estudos. Para a enzima de *Criptococcus sp.*, percebeu-se que a estabilidade do biocatalisador reduzia significativamente em temperaturas superiores as de atividade ótima da mesma (Kamini et al., 2000).

Além disso, diferentes íons metálicos tem a capacidade de aumentar a atividade enzimática. Dentre os trabalhos citados por (Sharma et al., 2001), observa-se que o íon mais comum que estimula a atividade dos catalisadores lipolíticos é o  $Mg^{2+}$  para todas as enzimas analisadas. Em segunda posição em frequência percebe-se o íon  $Ca^{2+}$ . Observa-se que também muitas lipases de diversos microrganismos tem máxima atividade em pH variando de 4,5 a 7,0. Mas ainda diversas lipases podem ter sua máxima atividade em regiões fora dessa faixa observada.



A busca por enzimas tolerantes a solventes orgânicos tem visado contornar o problema de inativação desses catalisadores biológicos quando o líquido orgânico é adicionado no meio reacional na concentração final desejada para a reação química. Porém, o desenvolvimento do método de adições sequenciais desses solventes no meio reacional no final da década de 1990 tem minimizado profundamente o problema de inativação da enzima (Fjerbaek et al. 2009), mas não elimina a necessidade de busca de enzimas mais resistentes a esses solventes.

A caracterização para solventes pode abordar duas realidades: buscar o efeito dos solventes na atividade enzimática e o efeito desses compostos na estabilidade das enzimas. Para o primeiro caso, incuba-se a enzima na solução tampão com o solvente e procede-se a análise da atividade. No segundo estudo, incuba-se a solução por mais tempo, em replicatas, e removem-se periodicamente as soluções incubadas para acessar a atividade residual das mesmas lendo-as contra a incubação em tempo inicial (Kamini et al., 2000).

Para uma enzima lipase ser candidata para a catálise de biodiesel, não deve ser muito estereoespecífica, deve catalisar a esterificação de ácidos graxos livres, tão bem quanto deve: ter baixa inibição com o produto da reação, ter alta atividade, ser reutilizável quando acoplada a suportes, ser estável em ambientes químicos com solventes orgânicos como o etanol e o metanol principalmente, além de que deverá possuir um processo de produção simples (Fjerbaek et al. 2009). Entretanto várias enzimas lipases tem se mostrado fortemente seletivas (Reis et al., 2009), enquanto outras já são tidas como candidatas para uma eficiente aplicação em transesterificações enzimáticas. Cada lipase tem de ser amplamente estudada para vislumbradas a partir de suas características, possíveis aplicações para a mesma.

Visto que várias tecnologias de amplo impacto com aplicação crescente na indústria como o delineamento experimental aplicado a parâmetros multifatoriais (Barros Neto et al., 2001), nota-se que a aplicação desses avanços pode proporcionar resultados de grande impacto em um ramo tecnológico que carece de inovações para adquirir espaço, como o setor de biocombustíveis. Além disso, *Moniliella spathulata* R25L270 tem se mostrado um microrganismo promissor para produção de lipases (Dias, 2010) e o conhecimento sobre sua purificação e sobre a característica de suas enzimas ainda não foi acessado. A combinação das tecnologias originadas em áreas diferentes é uma tendência que tem mobilizado diversos grupos de pesquisa em Minas Gerais (Barros, 2010). Integra-las passa ser um desafio para tentar solucionar os entraves no desenvolvimento encontrados no setor de biocombustíveis,

particularmente o de biodiesel. Sobretudo no que trata da produção de um catalisador barato, abundante, de alta atividade e estável frente à diversas condições físico-químicas.

## 2. Objetivo Geral

Determinar as principais variáveis e seus níveis que influenciam na produção da(s) lipase(s) de *Moniliella spathulata* R25L270, além de executar a purificação cromatográfica parcial desta(s) enzima(s) e caracterização da atividade das frações recolhidas.

### 2.1. Objetivos específicos

- Otimizar as condições de cultivo de *M. spathulata* R25L270 para crescimento, produção de enzimas lipases e compostos emulsificantes usando o delineamento fatorial de níveis mistos, considerando-se as seguintes variáveis: pH, concentração de fosfato, fontes de carbono, concentração das fontes de carbono, fontes de nitrogênio e concentração das fontes de nitrogênio
- Definir uma formulação matemática capaz de determinar as quantidades de sais de fosfato a serem adicionados aos meios de cultura a um certo valor de pH para a preparação dos cultivos, respeitando a independência destas variáveis.
- Identificar a influência que as fontes de carbono glicerol e óleo de oliva presentes no meio de cultivo exercem no padrão de produção de lipases pela levedura *Moniliella spathulata* R25L270 através de técnicas de purificação a partir das frações advindas de cada cultivo.
- Padronizar condições de purificação cromatográfica das lipases de *M. spathulata* R25L270 através do rastreamento das frações ativas
- Purificar parcialmente as lipases produzidas por *M. spathulata* R25L270 cultivada no meio de cultura com a fonte de carbono e formulação que resultou na maior produção da enzima.
- Caracterizar a atividade das enzimas parcialmente purificadas quanto à especificidade em relação a diferentes substratos p-fenil ésteres de ácidos graxos; ao efeito de cátions metálicos, temperaturas e diferentes pH.

### 3. Metodologia

#### 3.1. Otimização do cultivo

##### **3.1.1. Delineamento do planejamento fatorial para seleção de variáveis significativas sobre a produção de lipases e compostos tensoativos por *M. spathulata* R25L270.**

Para a triagens das variáveis significativas baseou-se no meio mineral suplementado ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0,1%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,05%, peptona 2,0%, fonte de carbono 1%) e sobre eles foi-se alterando-se as variáveis concentração da fonte de carbono, nitrogênio e fosfato e os seus níveis já reportados na literatura como indutores de produção de lipases de microrganismos.

##### **3.1.2. Definição da formulação matemática capaz de determinar as quantidades de sais de fosfato para a serem adicionados no meio de cultura a um certo pH para sua preparação.**

A determinação da formulação matemática para indicar as quantidades do sal de fosfato diácido e da sua base conjugada a serem adicionadas no meio de cultura em um pH desejado foi determinado a partir de cálculos utilizando de valores previamente tabelados (SCIENCEGATEWAY).

##### **3.1.3. Delineamento fatorial de níveis mistos L18**

O experimento de otimização seguiu o delineamento do tipo design de níveis mistos, que permite o estudo de dois ou mais níveis para cada variável em um único planejamento experimental. Esse planejamento foi feito através do programa SAS/STAT<sup>®</sup>. Avaliaram-se 5 variáveis com 2 níveis cada e 1 fator com 3 níveis em um planejamento de 18 experimentos (Tabela 1).

A preparação dos meios de cultura foi feita seguindo as orientações do planejamento fatorial dos anexos 2 (variáveis codificadas) e 3 (variáveis não codificadas), mas preparado de acordo com o Anexo 4. Inicialmente adicionou-se água em frascos Erlenmeyer de 250mL e, em seguida, os volumes necessários das soluções estoque de fosfato de potássio monobásico (0,125g/mL) e dibásico (0,5g/mL) e os volumes das soluções estoque das fontes de nitrogênio (0,5g/mL). Após essa etapa, era aferido o pH da solução e corrigido através da adição de HCl/NaOH quando necessário. Todos os frascos foram esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos. No momento da inoculação, em cada frasco, foi adicionado o volume indicado pelo delineamento de solução de peptona (0,5g/mL) além do volume indicado das fontes de carbono, óleo de oliva (Carbonell<sup>®</sup>, lote 11219B-75191) ou glicerol

(Isofar<sup>®</sup>, lote 101549). Essas soluções, por sua vez, foram esterilizadas em estufa a 180°C por 2h ou a 250°C por 1h anteriormente à adição nos frascos de cultivo. Nessa etapa, foram analisadas as respostas de atividade enzimática, densidade celular (DO), concentração protéica e atividade normalizada para proteína para expandir o conhecimento acerca da fisiologia de *M. spathulata* R25L270.

**Tabela 1 – Valores reais dos níveis de cada fator avaliado no delineamento fatorial de níveis mistos L18**

Fontes de variação	Níveis testados		
	1	3	2
fonte de carbono	Glicerol		óleo de oliva
[C] (%)	2		12
fonte de nitrogênio	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Uréia	NaNO <sub>3</sub>
[N] (%)	0,2		2,0
Fosfato (%)	0,03		1,00
pH	6,5		8,0
Peptona (%)		0,02	

#### 3.1.4. Delineamento fatorial completo (2<sup>k</sup>+1)

As variáveis significativas na atividade de lipase e atividade emulsificante (concentração da fonte de carbono, pH e fosfato) foram analisados em delineamento fatorial completo 2<sup>k</sup>+1 com 4 repetições no ponto central em um total de 12 experimentos para o quinto dia de cultivo. A resposta da atividade emulsificante foi incluída no estudo devido a grande produção desses compostos emulsificantes durante o cultivo de *M. spathulata*. Para ela foram tomadas no décimo primeiro dia de cultivo da levedura.

Os frascos foram inoculados conforme descrito no item 3.2 e incubados à temperatura de 28°C, sob agitação orbital a 180rpm durante 7 dias. Em intervalos de 24h, alíquotas de 2mL foram coletadas em ambiente estéril para avaliação da atividade enzimática do sobrenadante de cultivo pelo método do pNPP (descrito no item 3.5). A análise de variância (ANOVA) foi feita utilizando o software Minitab 16<sup>®</sup> no nível de 0,1 de significância estatística e os modelos de melhor ajuste para os dados foram determinados.

#### 3.1.5. Determinação das razões molares de sais de fosfato para obtenção de meios de cultivo com valores de pH definidos.

Como em um delineamento fatorial qualquer as variáveis devem ser necessariamente independentes, deveriam ser estabelecidas as condições para que o

pH e o fosfato uma vez selecionados como variáveis, assim o fossem nesse delineamento. Caso não fossem variáveis independentes, os efeitos reais das variáveis na resposta estariam confundidos, ocasionando erro.

Assumiu-se que a levedura, quando consumindo o fosfato inorgânico, consumiria tanto a forma ácida ou básica de maneira similar já que regularmente para a entrada do fosfato na célula, é necessário a protonação da forma dibásica do fosfato pela enzima transportadora. Não ocasionando variações no pH por esse consumo.

Devido as propriedades dos sistemas tampão, sabe-se que o pH de uma solução constituída por um ácido e sua base conjugada é determinado conforme dita a equação de Hendersel-Hasselbach:

$$pH = pK_a + \log \frac{[base\ conjugada]}{[ácido]}.$$

Dessa forma, como a variação do pH acontece somente quando houver mudança na proporção da base conjugada em relação ao seu ácido no sistema tampão, assumiu-se que, para o delineamento, o pH seria mantido pelo equilíbrio entre os sais de fosfato monobásico e dibásico adicionados no meio de cultura. Em contrapartida, os níveis de fosfato pretendidos seriam determinados pela soma das concentrações das formas ácida e básica do sal no meio. Ou seja, pretendendo-se obter 5% de fosfato no meio, essa concentração adviria da soma das espécies de fosfato no sal monobásico (ácida) e dibásico (base conjugada). Em outras palavras, denotando-se a fração percentual da massa de fosfato no sal monobásico de “a” e a fração em massa de fosfato no sal dibásico de “b”, temos que:

$$pH \propto \frac{b}{a}, e$$

$$\%_{fosfato} \propto a + b$$

Então foi desenvolvido um cálculo para se determinar a quantidade de sal que deveria ser adicionado em cada meio de cultura que atenderia tanto à condição de pH predeterminado, quanto à concentração total de fosfato pretendida nesse meio. Objetivou-se variar o pH de uma faixa desde 6,5 até 8,0, faixa com comprovada eficiência desse sistema tamponante ( $pK_{a_2} = 7,2$ ).

Inicialmente buscou-se uma relação matemática que descrevesse o pH em função da razão da massa de fosfato no sal monobásico e dibásico a partir das quantidades tabeladas dos tampões para ser alcançado o pH desejado (Jeffrey, 2007). Uma vez conhecido o volume das soluções estoque  $0,2\text{mol}^{-1}$  das soluções de fosfato

monobásico e dibásico que deveria ser adicionado em 1L de solução para alcançar-se um pH desejado, calculou-se a massa de cada sal, monobásico e dibásico que iria ser adicionada em um sistema tamponante hipotético de 1L para se alcançar aquele pretendido pH. Em seguida, calculou-se a porcentagem da massa de fosfato naquela massa de sal monobásico “a” ou dibásico “b” adicionado no mesmo sistema tamponante de 1L tomando-se a massa do íon fosfato em relação à massa de cada sal, considerando o grau de hidratação de cada uma das espécies salinas. Tendo esses valores de “a” e “b” de cada sal monobásico e dibásico, organizou-se uma tabela com as razões das frações em massa de fosfato “a/b” nos pH de 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0 conforme mostra a Tabela 2:

**Tabela 2 – pH em função da razão das massas dos sais de fosfato monobásico/dibásico em solução**

pH	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
razão	7,20	2,20	0,66	0,19	0,057

Em seguida, ajustou-se matematicamente uma regressão exponencial para os dados da Tabela 2 visto que o pH é proporcional pelo logaritmo da razão das concentrações das formas básicas e ácidas do sal em questão, como determina a equação de Hendersel–Hasselbach (dados não mostrados). A representação matemática dessa relação é representada como segue:

$$\text{Razão dos fosfatos nos sais monobásico e dibásico} = 15.28.10^6 e^{-2,43 x},$$

em que  $R^2 = 1,00$  e  $x = \text{pH}$

A notação matemática que melhor descreveu a curva da razão do fosfato no sal monobásico pelo dibásico tem um coeficiente de regressão máximo, permitindo com que seja calculada a quantidade de fosfato total no sistema (a+b) ao mesmo tempo em que determine seu pH.

Para sabermos as quantidades de sal de fosfato que deveriam ser adicionadas no meio de cultura, calculou-se então:

$$CF \times V = aC + bD, \quad \text{tal que}$$

$CF$ = Concentração de fosfato no meio (g/mL);

$V$ = volume do meio de cultura (mL);

$a$ = fração de fosfato no sal monobásico;

$C$ = massa de sal monobásico a ser adicionado no meio de cultura (g);

$b$ = fração de fosfato no sal dibásico;

$D$ = massa de sal dibásico a ser adicionado no meio de cultura (g);

Simplificando a função para a massa de sal monobásico a ser adicionada no sistema, temos que:

$$\frac{(CFxV) - bD}{a} = C, [x]$$

Por outro lado, é conhecida a relação do pH com as frações dos fosfatos nos sais monobásico e dibásico, denotado por (dados não mostrados):

$$\frac{aC}{bD} = 15.28 \cdot 10^6 e^{-2,43pH}, \text{ ou}$$

$$C = \frac{bD(15.28 \cdot 10^6 e^{-2,43pH})}{a} [y], \text{ tal que}$$

$a$  = fração de fosfato no sal monobásico;

$C$  = massa de sal monobásico a ser adicionado no meio de cultura (g);

$b$  = fração de fosfato no sal dibásico;

$D$  = massa de sal dibásico a ser adicionado no meio de cultura (g);

Substituindo  $[x]$  em  $[y]$ , temos:

$$\frac{(CFxV) - bD}{a} = \frac{bD(15.28 \cdot 10^6 \cdot e^{-2,43pH})}{a}, \text{ ou seja}$$

$$\frac{(CF x V) - bD}{bD} = 15.28 \cdot 10^6 e^{-2,43pH}$$

Isolando o sal dibásico que deve ser adicionado no sistema, temos:

$$D = \frac{(CF x V)}{b(1 + 15.28 \cdot 10^6 e^{-2,43pH})}$$

Nesse caso, como os valores de  $CF$  = Concentração de fosfato no meio;  $V$  = volume do meio de cultura, são determinados e  $a$  = fração de fosfato no sal monobásico;  $b$  = fração de fosfato no sal dibásico são calculados, pode-se saber a massa de sal de fosfato dibásico a ser adicionado no meio de cultura. Tendo posse desse valor, e substituindo o valor de  $D$  na fórmula  $[x]$  ou  $[y]$ , tem-se o valor de  $C$ .

Assim, obteve-se uma relação matemática que permitiu com que seja preparado o meio de cultura com maior precisão. Isso é importante porque mesmo que existam variações reais entre o valor de pH desejado e o observado, a necessidade de um ajuste desse pH seria reduzido, requerendo um volume mínimo de bases e ácidos fortes, diminuindo erros



### 3.1.1. Delineamento do planejamento fatorial para seleção de variáveis estudadas sobre a atividade lipásica de *M. spathulata* R25L270.

Baseando-se na composição meio de cultura em meio líquido até então utilizado para cultivo da levedura de estudo ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0,1%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,05%, peptona 2,0%, fonte de carbono 1%) foram feitas algumas mudanças em suas concentrações e feitos os primeiros delineamentos. Nele se inseriu a variável cloreto de cálcio devido suas propriedades de aumento produção de lipase para leveduras terem sido descritas (Sifour et al., 2010; Khoramnia et al., 2010) ainda que os níveis das variáveis selecionadas fossem maiores do que nos dois trabalhos da literatura (Tabela 3).

Fontes de variação	Níveis testados		
	A	B	C
Fonte de C	Glicerol		óleo de oliva
[C] (%)	0,5		12,0
Fonte de N	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Uréia	$\text{NaNO}_3$
[N] (%)	0,2		2,0
$\text{CaCl}_2$ (%)	0,1		1,0
Fosfato (%)	0,05		5,00
pH (%)	6,5		8,0
$\text{MgSO}_4$ (%)	0,05		1,50

Um primeiro delineamento fatorial de níveis mistos L36 do tipo  $2^7 + 3^1$  foi feito utilizando o software Minitab16<sup>®</sup> através do planejamento proposto na Tabela 3. Porém, na preparação dos meios de cultura foi visto que a presença tanto de cloreto de cálcio ou de sulfato de magnésio mesmo em concentrações reduzidas de 1,5% sobretudo nas condições de mais alto pH=8, acarretava na precipitação de ambos desses sais. Resolveu-se retirá-los para um próximo delineamento (Anexo 5).

Decidiu-se por modificar também o nível de carbono de 0,5% para 2%. Foram alterados níveis de fosfato de 0,03% a 1% posto que faixas muito amplas de variação entre os níveis inferior e superior poderiam camuflar efeitos reais na resposta causada pela diferença entre esses níveis quando uma alta concentração de uma variável tem efeito inibitório sobre o processo, similar a baixa concentração da variável no meio. Esse teste culminou com a determinação das variáveis e níveis do item 4.1.

### 3.2. Preparo do inóculo para cultivo

Para o preparo do inóculo, fez-se inicialmente a ativação metabólica das células preservadas em culturas estoque com glicerol a -30°C em placas de Petri contendo ágar Sabouraud (extrato de levedura 0,5%, peptona 1,0%; glicose 2,0%; ágar 2,0%) por 72 h a 25°C. Após esse tempo de cultivo, colônias foram suspensas com o auxílio de alça metálica em tubos de ensaio contendo 3,0mL de água destilada estéril. Alíquotas de 100µL desta suspensão foram transferidas para tubos contendo 900µL de água destilada estéril e submetidas a leitura da densidade óptica a 600nm em espectrofotômetro Shimadzu® UV-160A (podendo ser utilizada outra razão volumétrica, conforme a situação). Os valores de leitura obtidos, após correção das diluições realizadas, foram utilizados para a determinação do volume a ser transferido para os frascos Erlenmeyer de cultivos para se obter uma concentração inicial de células de 0,1 a partir da fórmula:

$$V_{in} = \frac{[sol].V_{sol}}{[A]}, \text{ tal que}$$

$V_{in}$  = Volume do inóculo (mL)

$[sol]$  = Densidade ótica da suspensão desejada.

$V_{sol}$  = Volume do meio de cultura (mL)

$[A]$  = Densidade ótica da suspensão A, de leitura conhecida

Considerou-se o volume de inóculo nulo ou não interferente no processo visto que seu volume fixo em todos os frascos não consistia em uma nova fonte de variação.

#### 3.2.1. Monitoramento do crescimento celular

As alíquotas de 1mL dos cultivos foram centrifugadas a 14.000g para precipitação das células. Retirou-se a porção superior de óleos emulsionados e tomou-se a porção do sobrenadante livre de emulsificantes para análises de atividade (item 3.5). O precipitado de células depositado ao fundo do tubo era ressuspenso em 1mL de água destilada para leitura de densidade ótica. Tomou-se 100µL dessa suspensão e adicionavam-se nela 900µL de água destilada antes do monitoramento da absorbância aparente (turbidez) em  $\lambda=600\text{nm}$  em espectrofotômetro Shimadzu® UV-160A.

#### 3.2.2. Atividade emulsificante no sobrenadante de meio de cultura

Retirou-se 10mL do meio de cultura líquido e centrifugou-se o mesmo a 4000g por 10 minutos a 4°C para precipitação das células. Retirou-se o sobrenadante e dele tomou-se 1mL em triplicata em tubos de ensaio de 5mL no qual adicionou-se 1,5mL

de tolueno Reagen<sup>®</sup>, lote 900726. Agitaram-se os tubos por 2 min em vórtex Clico Mixer Clay Adams<sup>®</sup> em velocidade máxima. Repousaram-se os tubos por 24h a temperatura ambiente e mediu-se a altura da camada emulsionada e total e a atividade emulsificante (E24) na amostra foi denotada como:

$$E24 = \frac{\text{altura da camada emulsionada}}{\text{altura total}} \times 100\%$$

### **3.3. Ensaios de purificação das enzimas lipases**

#### **3.3.1. Cultivo das leveduras**

Cultivou-se a levedura *M. spathulata* R25L270 no meio mineral suplementado (NH<sub>4</sub>OH 0,1%; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1%; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,05%; Peptona 2,0%) adicionado de óleo de oliva ou glicerol na concentração de 1%<sub>(v/v)</sub> cujas fontes de carbono foram esterilizadas separadamente em estufa a 180°C por 2 h ou a 250°C por 1 h. Os frascos foram incubados a 28°C a 180 rpm por 10 dias quando uma condição específica de tempo de cultivo não estivesse padronizada. Em cada um desses dias, era recolhida uma amostra de 1mL e armazenada em microtubos de 2 mL para posteriores análises.

### **3.4. Ensaios de padronização da purificação de lipase**

#### **3.4.1. Ensaios de padronização das metodologias de separação pelo rastreamento de atividade das frações eluídas da enzima a partir de cultivo não otimizado.**

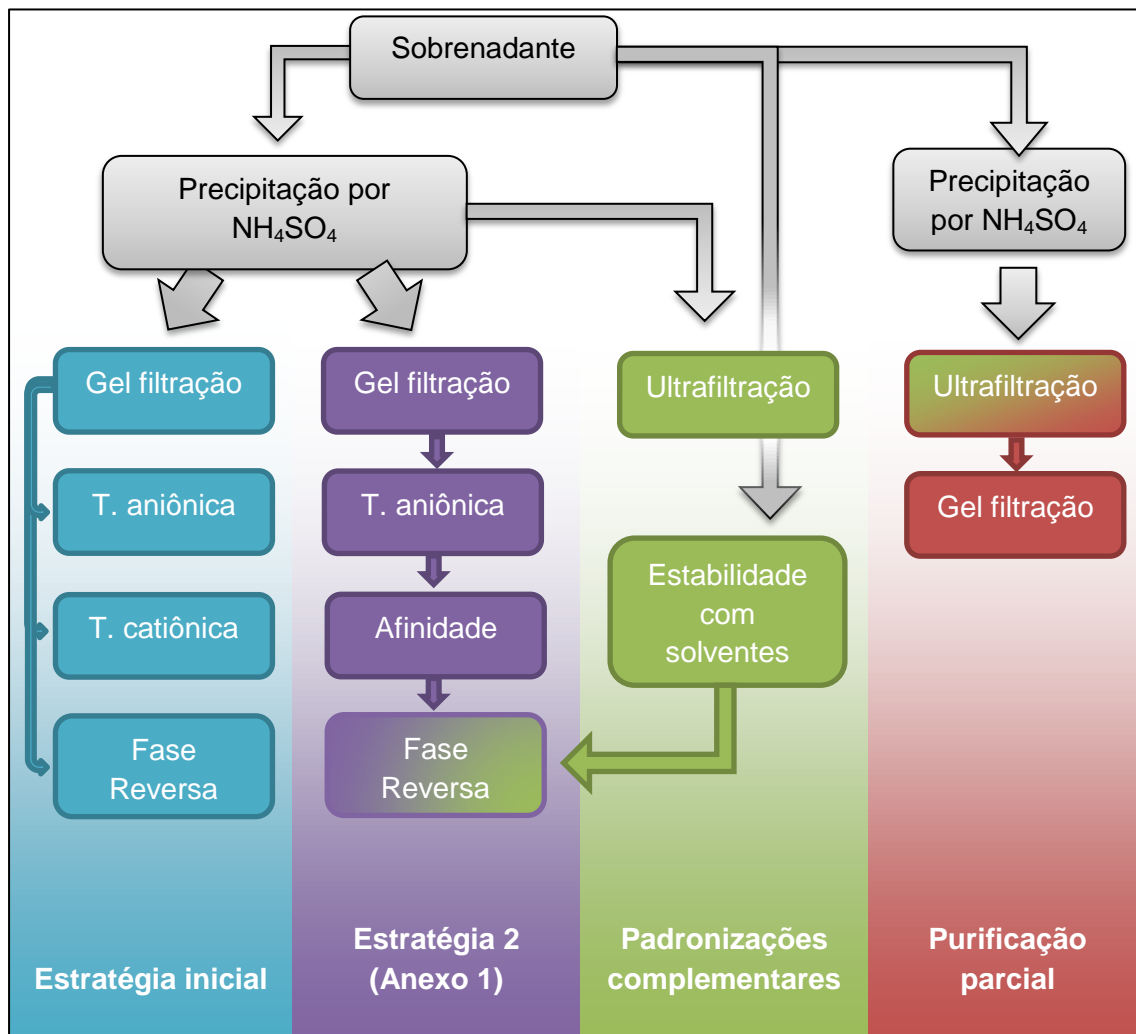
A estratégia de se buscar as melhores metodologias para se separar a lipase a partir do rastreamento das frações eluídas em cada passo cromatográfico foi feito se estudando a eficiência de cada uma das propostas individualmente: analisando o perfil cinético de atividade das frações obtidas sobrepondo-o no perfil da estimativa do conteúdo de proteínas mostrado no cromatograma. Em cada etapa procedimental foi feita uma sequência de experimentos de dosagem e atividade de proteínas, uma metodologia de purificação e o recolhimento de um pool de atividade para ser feita uma eletroforese. As frações foram nomeadas de acordo com o procedimento o qual iriam ser submetidas, recebendo sufixos específicos para cada etapa.

##### **3.4.1.1. Estratégias de purificação adotadas**

A estratégias de padronização e purificação da lipase de *M. spathulata* R25L270 foram representadas como mostra a Figura 6. Temporalmente a última tentativa correspondeu à série mostrada em vermelho da mesma figura, combinando precipitação por sulfato de amônio, ultrafiltração e gel filtração. As outras etapas foram

preliminares para a implementação dessa última técnica efetiva para purificação parcial da lipase.

A estratégia inicial seguiu o Fluxograma mostrado na Figura 6 em azul claro, combinando etapas iniciais de precipitação de sulfato de amônio do sobrenadante de cultivo da levedura, seguido de uma etapa de gel filtração. Os pools de frações ativas foram submetidos, em paralelo, à técnicas de troca aniônica, catiônica e fase reversa.



**Figura 6 - Fluxograma das padronizações da purificação de lipase de *Moniliella spathulata* R25L270 e metodologia de purificação parcial da enzima.** Cada cor corresponde a uma sequência de etapas procedimentais e as caixas em cinza indicam que a etapa foi comum. Cores mescladas indicam que a etapa foi realizada com o conhecimento adquirido de uma padronização complementar.

Uma etapa intermediária (Figura 6, seção verde) envolveu estudo da eficiência da técnica de ultrafiltração a partir do extrato de saturação de sulfato de amônio, mas também o estudo da estabilidade da lipase no sobrenadante de cultivo. Em seguida, foi testada mais uma estratégia de purificação (Figura 6, seção roxa e Anexo 1, com detalhes da nomenclatura das frações).

Quando as frações adviram de um cultivo com suplementação de óleo de oliva “O” ou glicerol “G” (Anexo 1), uma numeração subsequente à fração da etapa, representada pela letra, foi acrescentada depois da mesma indicando a porcentagem de saturação de sulfato de amônio em que ela foi recolhida, podendo ser 60% “6” ou 80% “8”. Em seguida, a codificação recebia mais um caractere “F” e numeração referentes ao conjunto de frações com atividade recolhidas no procedimento cromatográfico de gel filtração: “F1”, primeiro pool com atividade; “F2”, segundo pool com atividade; “F3”, terceiro pool com atividade. A codificação posteriormente receberia o caractere “T” e numeração 1, 2, 3, ..., n, referente ao conjunto de frações com atividade recolhidos na cromatografia de troca iônica. Não foi atribuída codificação para a etapa de cromatografia de afinidade, pois a metodologia de purificação poderia se encerrar antes da existência da etapa.

#### **3.4.1.1.1. Padronização da purificação parcial por sulfato de amônio**

Baseando-se em valores de referência pré-estabelecidos para o atingimento de uma condição de saturação de proteínas dado determinado volume de solução salina (Anexo 6), inicialmente foi feito o rastreamento da condição em que havia maior recuperação da atividade lipásica no precipitado de proteínas. Para isso, foram tomados os extratos obtidos em 20, 40, 60, 80 e 100% de saturação de sulfato que possuíam atividade enzimática. A purificação parcial nas amostras foi feita a partir da adição de sal suficiente para serem isoladas frações de saturação de 0–60% e de 60–80%.

Tomou-se um cultivo da levedura, centrifugou-se a 5000g para precipitação das células. Retirou-se o sobrenadante. Foi adicionada a quantidade de sal necessária para elevação do grau de saturação desejado de sulfato de amônio em um banho de gelo, sob agitação, até o nível preestabelecido. Centrifugou-se o sobrenadante a 14.000g a 4°C por 15min. Na última estratégia de purificação, as amostras foram centrifugadas a 100,000g em centrífuga Sorvall ultra pro B<sup>®</sup>. Após a centrifugação, os extratos protéicos adquiridos na metodologia de precipitação por sulfato de amônio foram ressuspendidas em 20mL de água reagente. Em seguida, uma alíquota (500µL) era retirada para dosagem proteica e atividade enzimática antes de ser executada uma nova estratégia de purificação cromatográfica.

#### **3.4.1.1.2.Purificação parcial por ultrafiltração**

Os extratos purificados parcialmente pela precipitação por sulfato de amônio foram ressuspendidas em volume variável de água reagente, que não excedia 25mL. Esse volume foi recolhido em tubos de centrífuga Amicon Ultra–15 Centrifugal Filter Units 30,000 NMWL (Nominal Molecular Weight Limit) com volume de 15mL e os mesmos tinham seus conteúdos devidamente contrabalanceados e centrifugados a 12,000g por 15min a 4°C em centrífuga Multifuge X3R heraeus Thermo®. Alíquotas das porções filtrada e retida pelo sistema de ultrafiltração foram recolhidas para posteriores análises de atividade enzimática e dosagem protéica.

#### **3.4.1.1.3.Cromatografia de Gel Filtração**

Uma vez o precipitado de proteínas obtido na desejada fração de saturação ter sido ressolubilizado, centrifugou-se a mistura de proteína concentrada em centrífuga Eppendorf® 5415 C a 16,000g por 15min a temperatura ambiente para precipitação de espécies não solúveis. 1,0mL de sobrenadante dessa nova solução foi aplicada em coluna Superose 12 HR 10/30 (GE Healthcare®) e eluída a 30,0mL/h em tampão 0,02mol<sup>-1</sup> de Tris–HCl pH 8,0. O acompanhamento da cromatografia se deu pelo monitoramento a 280nm com sensibilidade de 0,1. As amostras coletadas tiveram algumas das suas frações recolhidas para testes de dosagem de proteínas e atividade lipásica. O restante foi liofilizado.

#### **3.4.1.1.4.Cromatografia de Troca aniônica**

As amostras liofilizadas advindas de cromatografia de gel filtração foram ressuspendidas em tampão A: 0,02mol.L<sup>-1</sup> de Tris–HCl pH 8,0 e injetadas (1,0mL) em coluna Mono Q HR 5/5 (troca aniônica – Amersham Pharmacia Biotech®). As amostras foram eluídas contra um gradiente 0–100% 15–75min de tampão B: 0,02mol.L<sup>-1</sup> de Tris–HCl, 1,0mol.L<sup>-1</sup> de NaCl pH 8,0 a 60,0mL/h. O acompanhamento da cromatografia se deu pelo monitoramento a 280nm com sensibilidade de 0,1. As frações tiveram amostras coletadas que foram analisadas quanto à concentração proteica e atividade enzimática. O restante foi liofilizado.

#### **3.4.1.1.5.Cromatografia de Troca catiônica**

As amostras liofilizadas advindas de cromatografia de gel filtração foram ressuspendidas em tampão A: 0,02mol.L<sup>-1</sup> de acetato de sódio, pH 5,0 e injetadas (1,0mL) em coluna Mono S HR 5/5 (troca catiônica – Amersham Pharmacia Biotech®). As amostras foram eluídas contra um gradiente 0–100% de 15 a 75min com tampão B: 0,02mol.L<sup>-1</sup> de acetato de sódio, 1,0mol.L<sup>-1</sup> de NaCl pH 5,0, a 60,0mL/h. O

acompanhamento da cromatografia se deu pelo monitoramento a 280nm com sensibilidade de 0,1. As frações tiveram amostras coletadas que foram analisadas quanto à concentração proteica e atividade enzimática. O restante foi liofilizado.

#### **3.4.1.1.6.Cromatografia de Fase Reversa**

As frações com atividade recolhidas na cromatografia de troca iônica advindas de extrato com 80% de saturação purificado por gel filtração foram dialisadas por 15h a 4°C, concentradas e ressuspensas em 1,0mL de água regente antes de serem aplicadas em coluna Aquapore RP300 (Perkin Elmer®) acoplada em sistema HPLC. A coluna foi equilibrada com solução A: Ácido Trifluoracético (TFA) 0,05%, anterior a aplicação da amostra em cuja foi realizado um gradiente de 0-100% de solução B: TFA 0,05% em Acetonitrila em um tempo de 30 min sob um fluxo de 60mL/h. A corrida foi acompanhada pelo monitoramento contínuo das frações eluídas em comprimentos de onda a 280nm e 220nm, simultaneamente.

#### **3.4.1.1.7.Cromatografia de Afinidade**

A fração ativa advinda da cromatografia de troca iônica já concentrada por liofilização foi ressuspensa em 1,0mL de água reagente e aplicou-se a amostra em coluna de afinidade por heparina usando a coluna HiTrap Heparin HP (GE Healthcare®). As amostras foram eluídas com tampão A: 0,02mol.L<sup>-1</sup> de Tris-HCl pH 8,0 contra um gradiente 0-100% de B, 0,02mol.L<sup>-1</sup> de Tris-HCl, 1,0mol.L<sup>-1</sup> de NaCl pH 8,0 a partir de 15 até 25min com fluxo de 60,0mL/h.

### **3.5. Estudo do efeito de diferentes solventes orgânicos na atividade lipásica para escolha da fase móvel da cromatografia de fase reversa**

Foram tomados 10µL de sobrenadante de cultura apresentando atividade lipásica e foi adicionado com 10µL de solvente orgânico puro. O sistema foi incubado por 2min a temperatura ambiente e em seguida adicionado o reagente de cinética enzimática (180µL) para avaliação da alteração na atividade enzimática da enzima. Foram testados os solventes acetonitrila (ACN), butanol, dimetilsulfóxido (DMSO), etanol, isopropanol, metanol, e propanol.

### **3.6. Espectrometria de Massas pelo método de Ionização por Desorção Assistida por Matriz (MALDI)**

As frações contendo atividade nos picos obtidos na cromatografia de fase reversa (2.5.2.2) foram dialisados por 24 horas a 4°C. As amostras foram dissolvidas em uma solução saturada de ácido sinapínico ou de alfa-4-ciano-hidroxicinamico (5,0mg solução aquosa de TFA a 3%:acetonitrila:água 1:4:5, v/v) na proporção de 1:3

(v/v) amostra:matriz, e em seguida depositadas (0,5µL/poço) sobre uma placa MTP Anchor Chip 600/384 (Bruker Daltonics). As coletas foram feitas em espectrômetro de massas MALDI–TOF–TOF AUTOFLEX III (Bruker®) operando em modo linear positivo controlado pelo software Flex Analysis® (Bruker Daltonics). Cada espectro foi produzido por dados acumulados de 200 disparos consecutivos. A calibração do aparelho fora feita com o padrão Protein Calibration Standard II for Mass Spectrometry: Proteína A  $[M+ 2H]^{2+} = 22.306$ ; Tripsinogênio  $[M+ H]^+ = 23.982$ ; Albumina–Bovina  $[M+ 2H]^{2+} = 33.216$ ; Proteína A  $[M+ H]^+ = 44.613$ ; Albumina–Bovina  $[M+ H]^+ = 66.431$ .

### 3.7. Atividade enzimática pelo substrato sintético 4–nitrofenil palmitato

A atividade enzimática foi avaliada pela reação de hidrólise catalisada pela enzima com o substrato sintético 4–nitrofenil palmitato. Esse composto é hidrolisado na ligação éster, mais susceptível a ação da enzima, liberando o composto 4–nitrofenol, de coloração amarela. A reação de hidrólise é representada na Figura 7.

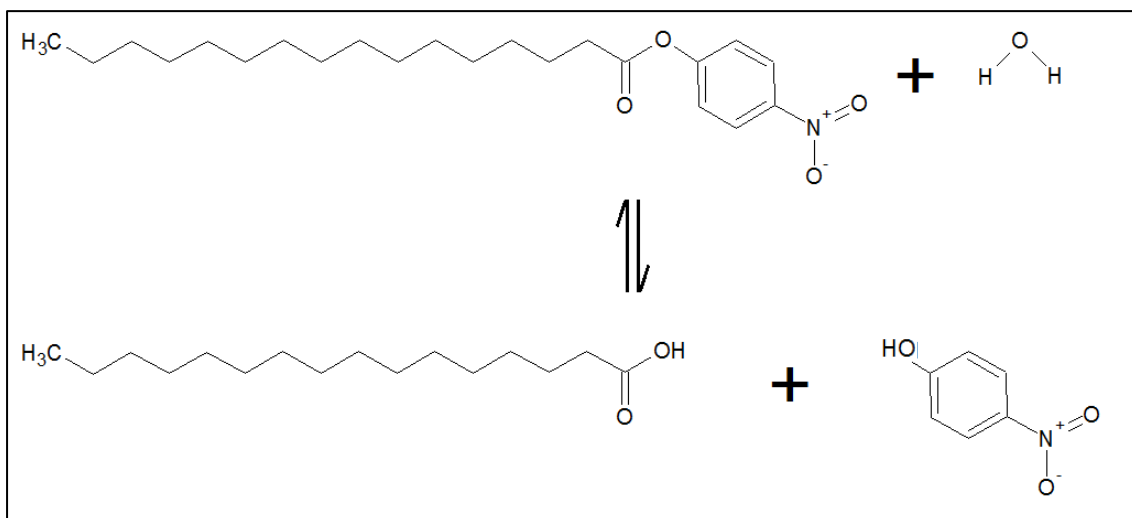
Preparam–se duas soluções. Uma primeira denominada solução A, dissolvendo 90,0mg de pNPP em 30,0mL de isopropanol e uma segunda solução B, adicionando 9,0g de triton X–100 (Sigma®, lote 45H0481) e 0,90g de goma arábica em 450mL de tampão Tris–HCl 0,09mol.L<sup>-1</sup> previamente ajustado para o pH 8,0. Essas duas soluções conjuntamente formam uma nova solução C utilizada nos testes cinéticos. Para se preparar essa solução adiciona lentamente 1 unidade volumétrica de solução A juntamente com 9 unidades volumétricas da solução B, quando essa última estiver sob agitação vigorosa e constante, preferencialmente à temperatura ambiente.

Adicionaram-se de 9 unidades volumétricas do reagente C para uma unidade volumétrica da amostra a ser testada. Para os testes cinéticos foram utilizados o espectrofotômetro Shimadzu® UV–160A ou o leitor de microplacas Spectramax 340, acoplado de software Softmax pro version 1.2.0 Molecular Devices Corporation® através de leituras a 410nm e a 37°C. Para ensaios cinéticos em espectrofotômetro, foram feitas leituras a cada 10 segundos por um período total de 500 segundos. Em leitor de microplacas foram feitas leituras a cada 11 segundos por 1800 segundos.

Os dados foram analisados por regressão linear quando o tempo de reação proporcionava uma reta de ajuste dos dados de atividade com um coeficiente de determinação  $R^2 > 0,95$ . Em análises quantitativas, utilizou–se do tempo em que se obtinha um coeficiente de regressão linear  $R^2 > 0,99$ . Uma unidade de atividade



enzimática foi considerada como sendo a quantidade de enzima que catalisa a liberação de 1  $\mu\text{mol}$  de pNP por minuto a 37°C em pH 8,0. Foi considerado um coeficiente de absorção molar do pNP igual a  $1,275 \times 10^4 \text{ mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  em pH 8,0 para



**Figura 7 - Reação de hidrólise do 4-nitrofenil palmitato (pNPP).** Uma molécula pNPP tem sua ligação éster hidrolisada, gerando ácido palmítico e pNP, cuja absorção é lida em 410nm.

cálculo da atividade.

### 3.8. Dosagem protéica dos sobrenadantes de cultivo e das frações recolhidas nos procedimentos cromatográficos.

As proteínas foram dosadas pelo método de Lowry em microplaca de 96 poços. Uma curva padrão foi feita utilizando enzima lipase comercial padrão de *Candida rugosa* type VII Merck lote L1754–100g ( $\text{ABS}_{\lambda 280} = 1,008$ , para 1,0mg/mL, utilizando-se a sequência da proteína 1TRH (Grochulski, et al., 1994) computada pela plataforma EcPASy (Wilkins, et al., 1999). Preparou-se uma solução de biureto utilizando proporção de (98:1:1) de soluções de carbonato de sódio alcalino a 2% (40g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 8g NaOH em 2L de H<sub>2</sub>O); CuSO<sub>4</sub> pentahidratado à 1% (0,2g CuSO<sub>4</sub> pentahidratado em 20mL H<sub>2</sub>O) e tartarato de sódio e potássio anidro a 1% em H<sub>2</sub>O (0,2g Tartarato de Na/K (5 H<sub>2</sub>O) em 20mL H<sub>2</sub>O). Adicionou-se em 20 $\mu\text{L}$  de amostra de lipase, 210 $\mu\text{L}$  de solução de biureto, aguardando-se 10 minutos. Posteriormente adicionou-se 50  $\mu\text{L}$  de solução de Folin–Ciocalteu diluída 3x. Repousou-se a mistura por 1 h e procedeu-se a leitura da solução a 750nm. Traçou-se uma regressão linear pelos pontos obtidos a partir de uma curva padrão feita com soluções em triplicata de concentrações de 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 e 900 $\mu\text{g/mL}$  utilizada para estimativa de proteínas na amostra. Tomou-se a curva com  $R^2 > 0,98$  para estimar a dosagem nas amostras.

### **3.9. Caracterização da atividade enzimática das frações purificadas de *M. spathulata* R25L270.**

#### **3.9.1. Caracterização da atividade enzimática das frações frente diferentes *p*-fenil esterres de ácidos graxos**

Para avaliar a especificidade da enzima frente aos diferentes esterres de 4-nitrofenil foi utilizada a reação do ítem 3.7, com modificações. Foram preparadas diferentes soluções estoque A, dissolvendo 90,0mg de pNPP em 30,0mL de isopropanol de 4-nitrofenil decanoato (pNPD) Sigma<sup>®</sup> lote 096K5201, 4-nitrofenil miristato (pNPM) Sigma<sup>®</sup> lote 1407516 e 4-nitrofenil palmitato (pNPP) Sigma<sup>®</sup> lote 109K5200V. Em seguida, preparou-se a solução C conforme o ítem 3.5 e submeteu-se as substâncias ao teste de cinética. Todos os controles da hidrólise espontânea do substrato em diferentes temperaturas foram feitos e subtraídos dos dados experimentais analisados.

#### **3.9.2. Caracterização da atividade enzimática das frações frente a diferentes temperaturas**

Para o estudo da temperatura ótima da enzima, foi preparada uma solução A de 4-nitrofenil decanoato 0,09mol.L<sup>-1</sup> (pNPD) Sigma<sup>®</sup> lote 096K5201 em isopropanol, conforme o ítem 3.7, mantendo as condições da solução B. A nova solução C ficava incubada por 5 minutos na temperatura de teste em cuveta de poliestireno antes da execução do mesmo. Para a fração purificada a partir do extrato entre 60–80% de saturação, testaram-se as temperaturas de 15, 25, 35, 45, 50, 55 e 60°C. Testaram-se as temperaturas de 5, 15, 25, 30, 35, 45, 55 e 60°C para a fração advinda do extrato de 0-60% de saturação. Os testes foram feitos em triplicata para os pontos de valores ótimos e em duplicata para as demais temperaturas.

#### **3.9.3. Caracterização da atividade enzimática das frações frente a diferentes cátions**

E especificidade da enzima frente aos diferentes ésteres de 4-nitrofenil foi acessada em um teste cinético utilizando o reagente C do ítem 3.7, acrescido de 0,03mol.L<sup>-1</sup> do íon de estudo e de um segundo tampão glicina 0,09mol.L<sup>-1</sup> (USB<sup>®</sup>, lote 119657). A solução foi ajustada para o pH 8,0 após a adição do sal correspondente. Prepararam-se soluções B com os íons cálcio, estrôncio, lítio, magnésio, potássio e sódio (LiCl, Vetec, lote 930309; CaCl<sub>2</sub>, Carlo Erba, lote 328757; K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, F. Maia, lote 37824; MgSO<sub>4</sub>, Riedel de Häen, lote 831308; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Mallinckrodt, lote 03435; SrCl, J.T. Baker, lote 41838).

#### **3.9.4. Caracterização da atividade enzimática das frações frente a diferentes valores de pH**

E especificidade da enzima frente a diferentes valores de pH de 4-nitrofenil foi acessada em um teste cinético utilizando o reagente C do ítem 3.7, acrescido de tampão composto por  $0,09 \text{ mol.L}^{-1}$  de glicina (USB<sup>®</sup>, lote 119657), Tris Aldrich lote 16114DE-267 e fosfato-citrato. A solução foi ajustada para o pH desejado com os ácidos ou bases conjugadas mais adequados para a faixa tamponada antes da realização do ensaio cinético. Foram testados os pH 2,6; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0; 9,5 e 10,3.

## 4. Resultados e discussão

### 4.1. Delineamento fatorial de Níveis Mistos L18

Foi observado no experimento de cultivo feito através do planejamento fatorial de níveis (L18, anexo 4) aumento da produção da enzima estava relacionado com o período de cultivo de levedura (Figura 8). Também percebeu-se que as diferentes combinações entre os níveis das variáveis nos distintos tratamentos, correspondentes aos frascos, produziam grande diferença na produção da lipase, exceto para as variáveis “fonte de N” e “PO<sub>4</sub>” (Figura 9). No entanto, o período em que se observou a maior atividade da enzima variou entre as diferentes combinações das variáveis e seus níveis. A maior atividade lipásica geral foi notada no frasco 8, com 88,8 U.L<sup>-1</sup> no sétimo dia de cultivo (Tabela 4). A partir da observação e teste sobre os dados experimentais de atividade nos diferentes tratamentos, foi encontrado o modelo de melhor ajuste para a atividade. Esse melhor ajuste se deu sobre a maior variação de atividade enzimática encontrada dentre os dias de cultivo (Figura 8).

A análise desse experimento foi feita tomando-se a variação entre as médias das atividades provocadas pelos dos níveis das variáveis mostrada na

**Tabela 4 – Resultados de atividade, densidade ótica, dosagem protéica e atividade normalizada por proteína para os diferentes tratamentos do delineamento de níveis mistos L18.**

Tratamento	Atividade Lipásica (U.L <sup>-1</sup> )	DO ( $\lambda_{600nm}$ )	Dosagem proteica (mg/L)	Atividade específica (U/mg)
1	3,027	0,09	1263	0,002397
2	10,559	0,37	1764	0,005984
3	2,609	0,17	1430	0,001825
4	1,468	0,24	1397	0,001051
5	0,859	0,54	1804	0,000476
6	6,299	2,00	1203	0,005235
7	0,555	-0,05	717	0,000775
8	88,802	1,53	3769	0,023562
9	0,384	-0,02	2973	0,000129
10	17,044	10,22	7233	0,002356
11	0,422	-0,05	2724	0,000155
12	0,555	0,31	2240	0,000248
13	71,723	5,52	1987	0,036102
14	24,918	3,03	1707	0,014601
15	2,669	0,63	1698	0,001572
16	67,657	5,90	1942	0,034835
17	1,164	0,26	1587	0,000734
18	44,165	1,56	2271	0,019447

**Tabela 6 – Efeito das variáveis sobre a médias das atividades (U.L<sup>-1</sup>). O nível de confiança foi de 90% (p<0,1)**

<b>Termo</b>	<b>Coefficiente</b>	<b>EP(calc)</b>	<b>T</b>	<b>p</b>
Constante	20,84	5,65	3,69	0,006
Fonte C 1	-7,75	5,55	-1,40	0,200
[C] 1	-13,1	5,55	-2,35	0,046
Fonte N 1	-16,1	7,70	-2,09	0,070
Fonte N 2	18,4	8,54	2,15	0,063
[N] 1	-0,634	5,55	-0,11	0,912

Sal KPO4 1	-1,62	5,55	-0,29	0,778
pH 1	-9,90	5,55	-1,79	0,112
		$s^2 = 22,18$		
		$r^2 = 67,5\%$		
<b>EP(calc) = erro padrão calculado; T = valor T calculado; P = valor p calculado para a variável; s<sup>2</sup>= variância</b>				

A partir desse pressuposto, observando a Tabela 6, percebeu-se que o valor de predição da resposta pelas variáveis experimentais testadas  $r^2 = 67,5\%$ , sugere que possa existir outras variáveis influenciando na resposta alcançada. Ainda assim percebeu-se que esse valor de coeficiente era minimamente satisfatório para rejeição de ao menos “Sal KPO<sub>4</sub>” e “[N]” devido aos seus elevados valores p preditos (Figura 9).

Porém, para a exclusão da variável que menos explicasse a variação na atividade enzimática para o sétimo dia, excluiu-se a variável menos significativa e manteve-se as demais. Sendo assim, foram consideradas significativas as variáveis “fonte C”; “[C]”, “fonte N”, “sal KPO<sub>4</sub>” e “pH”. Para um segundo experimento de otimização de deslocamento ascendente, decidiu-se por retestar essas variáveis.

Diversas das variáveis já escolhidas para o próximo passo de otimização poderiam não ter sido selecionadas caso a decisão para suas seleções fosse feita a partir do modelo predito, já que várias delas, pelo modelo, não se mostravam significativas (Figura 9). Isso ocorreria caso fossem excluídas as variáveis “fonte C”; “sal KPO<sub>4</sub>” e “pH” para ir para a próxima etapa de otimização.

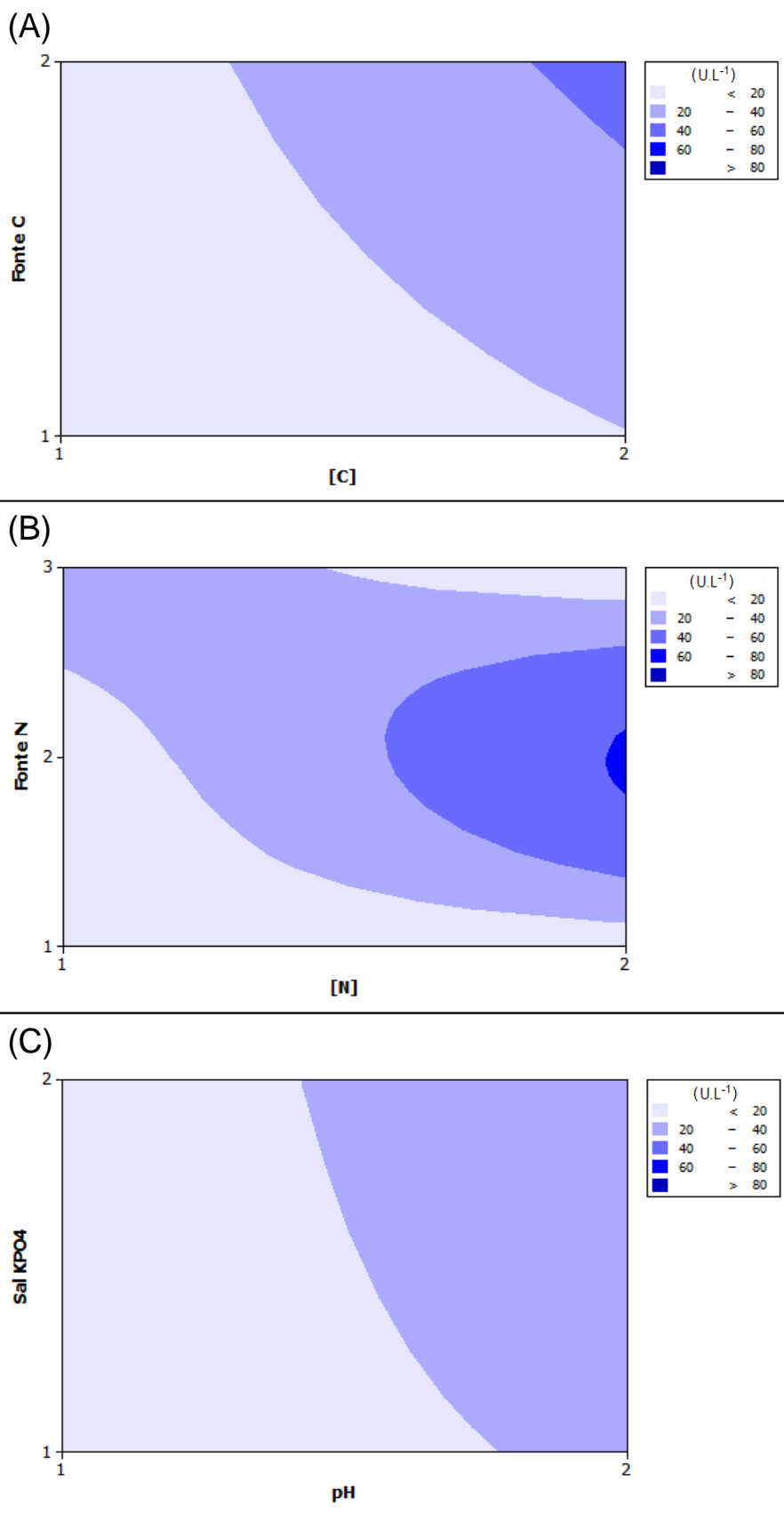
Sendo assim, preferiu-se decidir eliminar a variável menos significativa indicada pelo modelo “[N]” e continuar a testar aquelas outras indicadas pelo modelo como não significativas “fonte C”; “sal KPO<sub>4</sub>” e “pH” devido o ajuste do modelo predito não ter sido muito alto. Também percebeu-se que mais valia continuar testando uma variável não significativa cometendo erro do tipo I do que correr o risco de eliminar do planejamento fatorial uma variável significativa (erro do tipo II) o que constituiria um grande equívoco.

O modelo descrito para os dados estudados pôde ser descrito pelas variáveis significativas mostradas na Tabela 6. Denotando [C] = a; Fonte N (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = b; Fonte N NaNO<sub>3</sub> = c; e a constante com seu valor nominal, proporcionou:

$$\text{Atividade (U.L}^{-1}\text{)} = 20,8 - 13,1 a - 16,1 b - 18,4 c$$

Uma demonstração gráfica dos efeitos causados pelas variáveis testadas na atividade enzimática é possível pelos gráficos de efeito (Figura 10). Eles mostraram menor contribuição das variáveis “Fonte N”; “Sal  $KPO_4$ ” e “pH” para explicar a atividade enzimática. Para as variáveis “Sal  $KPO_4$ ” e “pH”, houve baixa correlação entre a mudança de seus níveis refletindo na alteração na atividade enzimática (gráfico C), efeito mais pronunciado nos gráficos A e B da Figura 10. Para o gráfico B, percebeu-se de que a variável concentração da fonte de nitrogênio pode ter efeito de segunda ordem quando analisada em uma combinação com a fonte de nitrogênio nitrato de sódio empregada. Isso, porém, não é visto para as fontes 1 e 3 ( $NH_4NO_3$  e Uréia), possivelmente porque essas fontes não interferem incentivando a produção global de lipase. Portanto a atividade enzimática não sofre alteração na presença delas.

No estudo de fatorial de níveis mistos L18 de *M. spathulata* R25L270 também foi analisado o efeito das variáveis na densidade ótica (DO) para o sétimo dia de



**Figura 10 – Curva de contorno da influência das variáveis de estudo na atividade enzimática.** (A)= Fonte de carbono versus concentração da fonte de carbono; (B)= Fonte de nitrogênio versus concentração da fonte de nitrogênio; (C)= fosfato de potássio versus pH.



cultivo. Nessa análise, notou-se um perfil de resultados bastante distinto daquele obtido para as atividades. Percebeu-se pelo gráfico mudanças nos perfis de influência das variáveis “[N]” e “pH” (Figura 11) sobre a densidade ótica. Na análise anterior percebeu-se maiores atividade enzimática quanto maiores foram os níveis dessas variáveis. Percebeu-se também maior significância estatística do fosfato de potássio para explicar a resposta para densidade ótica (DO).

Ainda que existiram variações na densidade ótica representadas pelos gráficos (Figura 11), nenhuma das variáveis explicaram a densidade celular do cultivo devido ao  $p > 0,1$  (Tabela 7).

Apenas a constante do modelo ajustado explicaria a densidade ótica ( $p$ -valor= 0,018) uma vez que nenhum dos parâmetros estudados influenciou a DO do meio. Dessa forma, o modelo que melhor se ajustou à densidade ótica para o sétimo dia de cultivo foi expresso por:

$$\text{Densidade Ótica } (DO_{\lambda 600nm}) = 1,91$$

A predição das variáveis que influenciam a dosagem pelo modelo mostrou que somente a variável concentração da fonte de carbono influenciava significativamente a produção protéica como mostrou a Tabela 8.

**Tabela 8 - Efeito das variáveis sobre a médias para médias das dosagens protéicas ( $\mu\text{g/mL}$ ). O nível de confiança foi de 90% ( $p < 0,1$ ).**

Termo	Coeficiente	Coef. erro	T	p
Constante	2204	315,1	6,996	0
Fonte C 1	-429,9	309,5	-1,389	0,202
[C] 1	-604,8	309,5	-1,954	0,086
Fonte N 1	-727,5	429,5	-1,694	0,129

Fonte N 2	-344,0	476,4	-0,722	0,491
[N] 1	444,9	309,5	1,438	0,188
Sal KPO <sub>4</sub> 1	-81,32	309,5	-0,263	0,799
pH 1	55,07	309,5	0,178	0,863
<hr/>				
$S^2 = 1238$				
<hr/>				
$r^2 = 64,9\%$				
<hr/>				
<b>Coef. Erro = valor nominal do erro calculado; T = valor T calculado; P = valor p calculado para a variável; S<sup>2</sup>= variância</b>				

Percebeu-se pelos resultados que a levedura de estudo não discriminou o tipo da fonte de carbono como determinante para a produção de suas proteínas (Tabela 7) quando isso acontece para a atividade enzimática (Tabela 6), pode se esperar que a levedura produza mais enzimas ativas.

Sendo assim, possivelmente a produção da lipase esteja ligada a concentração da fonte de carbono existente no meio, pois na presença do menor nível dessa variável no delineamento, menos proteína foi detectada em relação à média global e também menor atividade lipásica no sobrenadante foi observada.

Em relação à concentração protéica do meio, o modelo que melhor se ajustou aos dados estudados pôde ser descrito pelas variáveis significativas mostradas na Tabela 8. Denotando [C] = d; e a constante com seu valor nominal, obteve-se:

$$\text{Concentração proteica } (\mu\text{g/mL}) = 2204 - 604,8 d$$

Analisada a Figura 12, também se percebeu maior associação entre a produção de proteína e uréia, diferindo dos dados tanto de atividade lipásica e densidade ótica influenciadas para a fonte de nitrogênio já que, para aquelas variáveis, houve melhor associação para o nitrato de sódio.

Uma nova análise fora feita para as respostas advindas dos dados da atividade normalizada, ou seja, a razão atividade sobre dosagem protéica. Interessantemente, para as respostas das variáveis concentração da fonte de carbono e pH mostradas na

Figura 13 mostraram que quanto maiores eram os níveis das variáveis, maiores eram as respostas.

O efeito atividade normalizada estudada se trata de uma razão numérica na qual a dosagem protéica é o denominador. Sendo assim elevadas médias para atividade enzimática causadas pelo efeito de uma variável aliadas à baixas médias para dosagem proteica para essa mesma variável, acarretaria em altos efeitos para associar essa variável à atividade normalizada. Sendo assim a Figura 13 pode ser melhor compreendida.

A fonte nitrato de sódio (Figura 12, fonte B da tabela 3) apresentou efeito menos pronunciado para explicar a dosagem protéica em relação à fonte 3, uréia, naquele gráfico. Também nitrato de sódio foi a fonte mais significativa para explicar a atividade enzimática (Figura 9).

Logo para os dados da atividade normalizada, a fonte de nitrogênio nitrato de sódio foi a mais significativa ( $p=0,005$ , Tabela 9) para explicar o aumento da atividade normalizada dentre as demais no planejamento experimental (Figura 13).

Isso implica que sua utilização em um próximo delineamento, além de serem esperados valores totais de atividade lipásica mais elevados, espera-se que a lipase seja encontrada em um sistema menos heterogêneo, facilitando possivelmente subseqüentes purificações do catalisador.

Para a resposta de atividade específica, o modelo que melhor se ajustou aos dados estudados pôde ser melhor descrito pelas variáveis significativas mostradas na Tabela 9. Denotando [C] = e; Fonte de N1 (sulfato de amônio) = f; Fonte de N2 (nitrato de sódio)

= g e pH = h

e a

**Tabela 9 – Coeficientes de regressão para médias das atividades das enzimas lipases normalizadas pela dosagem protéica (U.L/ $\mu$ g)**

Termo	Coeficiente	Coef. erro	T	p
Constante	0,00904	0,00185	4,90	0,001
Fonte C 1	-0,00232	0,00181	-1,28	0,236
[C] 1	-0,00450	0,00181	-2,48	0,038
Uréia	-0,00620	0,00252	-2,47	0,039
NaNO <sub>3</sub>	0,01070	0,00279	3,84	0,005
[N] 1	-0,00198	0,00181	-1,09	0,306
Sal KPO <sub>4</sub> 1	-0,00170	0,00181	-0,94	0,375
pH 1	-0,00369	0,00181	-2,04	0,076

$$S^2 = 0,007251$$

$$r^2 = 78,3\%$$

**Coef. Erro = valor nominal do erro calculado; T = valor T calculado; p = valor p calculado para a variável; S= variância.**

constante com seu valor nominal, obteve-se:

$$\begin{aligned} \text{Atividade normalizada} \left( \frac{U}{\mu\text{g} \cdot 10^3} \right) \\ = 0,00904 - 0,00450e - 0,00620f + 0,01070g - 0,00369h \end{aligned}$$

Pela metodologia de fatoriais de níveis mistos, foi possível aqui eliminar uma das seis variáveis estudadas no primeiro planejamento fatorial. Também se rejeitou a hipótese da significância das variáveis uréia e nitrato de amônio como fontes de nitrogênio e também glicerol como fonte de carbono como as mais significativas para explicar a atividade enzimática, resposta escolhida para a otimização devido a capacidade de conversão de óleo em biodiesel ser determinado por essa resposta.

Na otimização da produção de lipase por *Pseudomonas aeruginosa* B-3556 utilizando da metodologia de Taguchi objetivou-se estimar variáveis e os ruídos com dois níveis que influenciavam os processos para aumentar a robustez do processo (Sabbaghian & Roostaazad, 2005).

Pelo estudo ocorreu redução dos 9 variáveis estudadas inicialmente para apenas 4 na segunda repetição da metodologia. Outra aplicação do planejamento fatorial de níveis mistos acarretou na diminuição de iniciais 8 ( $7^3+1^2$ ) variáveis para 4 ( $4^3$ ) variáveis que se mostraram significativos para a resposta pretendida. Essas variáveis foram submetidas a um delineamento composto central rotacional (Yu et al., 2007).

No caso da otimização da produção de lipase através da busca das variáveis que explicavam a atividade lipásica, observou-se que a melhor condição na qual a lipase pôde ser produzida foi aquela em que a [C] = 6%; fonte de carbono = óleo de oliva; pH = 8,0, fonte de nitrogênio =  $\text{NaNO}_3$ ; e  $[\text{KPO}_4] = 1\%$ . Como percebeu-se baixa influência da variável [N] na atividade lipásica excluiu-a para um próximo delineamento, mantendo as demais variáveis junto à nova etapa de otimização.

## **4.2. Otimização do cultivo: Delineamento Fatorial completo ( $2^k + 1$ )**

### **4.2.1. Otimização para Óleo de Oliva**

O delineamento de fatorial completo ( $2^k+1$ ), com quatro repetições no ponto central, mostrado no item 3.1.3 foi empregado para serem selecionadas as variáveis, seus níveis e também o efeito possível da combinação das variáveis em primeira, segunda ou até terceira ordem que interferiam a atividade enzimática de *M. spathulata* R25L270. As variáveis e níveis utilizados nessa seção foram estipulados a partir do item 4 – fatorial de níveis mistos.

Utilizou-se de um meio base para cultivo com concentrações fixas de nitrato de sódio a 0,1% e peptona 0,3% e concentrações variáveis de fonte de carbono (3 e 9%) (óleo de oliva ou glicerol); fosfato de potássio (0,1 e 1,5%), além do pH (6,5 e 8,0) (Tabela 10). Verificam-se na Tabela 10 também os resultados de atividade emulsificante e atividade lipásica.

**Tabela 10 – Delineamento fatorial completo ( $2^3+1$ ) com 4 repetições no ponto central para seleção das variáveis (codificadas e não codificadas) que influenciam nas respostas de atividade e atividade emulsificante de *Moniliella spathulata* R25L270 com glicerol e óleo de oliva como fontes de carbono.**

Ensaio	Codificadas			Não codificadas			Atividade (U.L <sup>-1</sup> ) óleo de oliva	Atividade emulsificante (%)	Atividade (U.L <sup>-1</sup> ) glicerol
	[C]	pH	PO <sub>4</sub>	[C]	pH	PO <sub>4</sub>			
1	-1	-1	-1	3	6,5	0,1	31,6282	84,00	0,6086
2	1	-1	-1	9	6,5	0,1	26,1317	86,67	0,1902
3	-1	1	-1	3	8	0,1	11,6585	93,33	0,7037
4	1	1	-1	9	8	0,1	26,8735	84,00	0,1711
5	-1	-1	1	3	6,5	1,5	9,5094	86,67	0,1902
6	1	-1	1	9	6,5	1,5	10,118	85,33	0,000
7	-1	1	1	3	8	1,5	0,6657	86,67	0,1522
8	1	1	1	9	8	1,5	-1,3503	52,00	0,3233
9	0	0	0	6	7,25	0,8	15,5954	86,67	0,1141
10	0	0	0	6	7,25	0,8	7,2461	88,00	0,2282
11	0	0	0	6	7,25	0,8	6,3332	94,67	0,1522
12	0	0	0	6	7,25	0,8	7,1701	86,67	0,1712

A análise de variância para os valores reais de atividade emulsificante, a 10 % de significância ( $p>0,1$ ) para o décimo primeiro dia de cultivo revelou que nenhum dos componentes do meio se apresentaram como variáveis significativas para a atividade surfactante (Tabela 11).

Sobre os dados de atividade emulsificante do Tabela 11, percebeu-se pouca variação nos resultados ( $r^2 = 47,8\%$ , Tabela 11), exceto para o frasco 8. A média, ou constante (Tabela 11), foi o único item que apresentou confiabilidade estatística

( $p < 0,1$ ). Indicando que independente dos níveis das variáveis, obteve-se um valor médio de emulsificante nos frascos de 82,3%.

Em relação às atividades enzimáticas para o dia em que foi encontrada a maior atividade, quinto dia, para o mesmo nível de significância de 10%, foi encontrado que as variáveis fontes  $PO_4$  e pH possuíam maior significância estatística para explicar a produção de lipase através dos seus respectivos p-valores, de 0,001 e 0,021 (Tabela 12). Nenhum efeito de segunda ordem pôde ser observado para essas variáveis.

Inicialmente o ajuste do modelo não apresentou significância estatística quando incluía a variável [C]. Assim, um novo modelo foi gerado excluindo essa variável e mantendo as demais, levando a um melhor ajuste desse novo modelo que, por sua vez, apresentou que 84,7% dos valores de atividade foram explicados pela alteração dos níveis das variáveis para o modelo linear.

**Tabela 11 – Coeficientes de regressão e tabela ANOVA para médias da porcentagem de emulsificante (%<sub>(v/v)</sub>) no décimo primeiro dia do planejamento fatorial completo com óleo de oliva.**

Fonte de variac	Grau Liber	Soma Quad	Soma Quad Ajust	Média Quad Ajust	Efeito	Coef	Erro padr Coef	F	T	p
Const	3	490,67	490,67	163,56		82,3	3,4	1,72	23,9	0,000
[C]	1	227,56	227,56	227,56	-10,7	-5,3	3,4	2,39	-1,6	0,166
pH	1	88,89	88,89	88,89	-6,7	-3,3	3,4	0,94	-1,0	0,366
$PO_4$	1	174,22	174,22	174,22	-9,3	-4,7	3,4	1,83	-1,4	0,218
Curv	1	118,52	118,52	118,52		6,7	6,0	1,25	1,1	0,301
Erro Res	7	665,33	665,33	95,05						
Erro Ajust	4	621,33	621,33	155,33					10,59	0,041
Erro puro	3	44	44	14,67						
Total	11	1274,52								
$S^2 = 9,7$										
$r^2 = 47,8\%$										
<b>Variac=variação; Trat=tratamento; Liber=liberdade; Soma Quad=soma quadrática; Ajust=ajustado; Padr=padrão; Curv=curvatura; Coef=Coeficiente; F=valor F; T=valor T; p=valor p.</b>										

Percebeu-se que a concentração da fonte de carbono não foi determinante para explicar a atividade lipásica no cultivo utilizando óleo de oliva (Tabela 12),

contrariando as análises do primeiro delineamento fatorial de níveis mistos (item 4.2) em que essa variável era tida como significativa (Tabela 6). Notou-se também que embora o pH e o fosfato tenham aparecido como significativos para o fatorial completo (Tabela 12), eles não foram apontados como variáveis candidatas a otimização no experimento de fatorial de níveis mistos se fosse pretendido eliminar todas as variáveis não significativas indicadas ao invés de eliminar a variável menos significativa, como foi feito (Tabela 6).

O modelo matemático que melhor descreveu os dados de atividade desse delineamento pôde ser descrito a partir dos dados da Tabela 12 com a seguinte equação:

$$\text{Atividade (U.L}^{-1}\text{.s}^{-1}\text{)} = 73,23 - 6,59 i - 13,81 j$$

na qual denominou-se pH = i e a concentração do sal de fosfato = j.

**Tabela 12 – Coeficientes de regressão e tabela ANOVA para as médias das atividades (U.L<sup>-1</sup>) para o quinto dia de cultivo do planejamento fatorial completo com óleo de oliva.**

Trat	Grau Liber	Soma Quad	Soma Quad Ajust	Média Quad Ajust	Efeito	Coef	Erro padr Coef	F	T	p
Const	2	943,29	943,29	471,64		14,4	1,72	19,84	8,36	0,000
pH	1	195,43	195,43	195,43	-9,89	-4,94	1,72	8,22	-2,87	0,021
PO <sub>4</sub>	1	747,86	747,86	747,86	-19,3	-9,67	1,72	31,45	-5,61	0,001
Curv	1	75,42	75,42	75,42		-5,32	2,99	3,17	-1,78	0,113
Erro Res	8	190,22	190,22	23,778						
Erro Ajust	1	0,15	0,147	0,147				0,01		0,943
Erro puro	7	190,08	190,08	27,154						
Total	11	1208,93								

$$S^2 = 4,88$$

$$r^2 = 84,3\%$$

**Const= constante; Trat=tratamento; Liber=liberdade; Soma Quad=soma quadrática; Ajust=ajustado; Padr=padrão; Curv=curvatura; Coef=Coeficiente; F=valor F; T=valor T; p=valor p.**

Observou-se uma significativa influência das variáveis pH e fosfato para explicar o aumento da atividade enzimática visto o incremento que é proporcionado na atividade quando qualquer uma das duas variáveis é diminuída (Figura 14).

Sabe-se que tanto mais é confiável um planejamento fatorial, quando as condições para serem feitas as análises são melhor planejadas e executadas. Eliminou-se assim a realização de experimentos desnecessários por serem excluídas

combinações a serem testadas inutilmente, quando, por exemplo, as variáveis a serem experimentados não produzem efeito na variável resposta.

Dessa forma, selecionam-se e testam-se apenas aquelas variáveis que produzem resultados efetivos, economizando tempo, reagentes e outros capitais. Assim, tendo em vista as condições disponíveis na primeira situação de análise do experimento fatorial de níveis mistos, tomaram-se as decisões mais conservadoras naquela etapa tendo em vista não serem cometidos erros do tipo II ao eliminar o PO<sub>4</sub> ou o pH por exemplo.

Preferiu-se arriscar em cometer o risco de erro de manter um fator com um efeito não significativo, levando-o para um próximo delineamento em cujo planejamento experimental seu efeito poderia ser melhor analisado. A eliminação errônea impediria que a eficácia do efeito da variável fosse atestada em um experimento seguinte. Assim, eliminou-se somente, a variável concentração da fonte de nitrogênio que não foi testada no planejamento fatorial completo.

#### 4.3.2.Otimização para Glicerol

O delineamento de fatorial completo ( $2^k+1$ ), com quatro repetições no ponto central, mostrado no ítem 3.1.3 também foi selecionado para otimização de glicerol. Utilizou-se de um meio base para cultivo com concentrações fixas de nitrato de sódio a 0,1% e peptona 0,3% e concentrações variáveis de fonte de carbono (óleo de oliva ou glicerol); fosfato de potássio, além do pH (Tabela 10).

**Tabela 13 – Coeficientes de regressão e tabela ANOVA para as médias das atividades (U.L<sup>-1</sup>) para o quinto dia de cultivo do planejamento fatorial completo com glicerol.**

Trat	GL	SQ	SQA	MQA	Efeito	Coef	EPC	F	T	p
CsT	3	0,27219	0,27219	0,09073		0,29	0,0235	20,48	12,3	0
[C]	1	0,12226	0,12226	0,12226	-0,247	-0,124	0,0235	27,59	-5,25	0,003
pH	1	0,01809	0,01809	0,01809	0,0951	0,0475	0,0235	4,08	2,02	0,099
PO <sub>4</sub>	1	0,13184	0,13184	0,13184	-0,257	-0,128	0,0235	29,76	-5,45	0,003
[C] *	1	0,10417	0,10417	0,10417	0,228	0,114	0,0235	23,51	4,85	0,005



PO <sub>4</sub>										
[C] *										
pH *	1	0,10417	0,10417	0,10417	0,124	0,0618	0,0235	6,9	2,63	0,047
PO <sub>4</sub>										
Curv	1	0,03057	0,03057	0,03057		-0,124	0,0408	9,2	-3,03	0,029
Erro Res	1	0,03057	0,03057	0,03057						
Erro Ajus	1	0,04075	0,04075	0,04075				3,4		0,169
Erro puro	5	0,02216	0,02216	0,00443						
Total	2	0,01537	0,01537	0,00767						

$$S^2 = 0,066$$

$$r^2 = 95,28\%$$

**CsT= constante; Trat=tratamento; GL=graus de liberdade; SQ=soma quadrática; SQA= soma quadrática ajustado; SQM= soma quadrática média; EPC=erro padrão do coeficiente; Curv=curvatura; F=valor F; T=valor T; p=valor p.**

Percebeu-se que as variáveis [C], pH e PO<sub>4</sub> foram significativas para explicar a variação da atividade lipásica (p-valores 0,003; 0,099 e 0,003, respectivamente). Também interações de segunda ordem com [C]\*PO<sub>4</sub> e terceira ordem [C]\*pH\*PO<sub>4</sub> foram significativas para explicar essa mesma variação (p-valores 0,005 e 0,047) (Tabela 13).

Inicialmente o ajuste do modelo não apresentou significância estatística quando foram consideradas as interações de [C]\*pH e pH\*PO<sub>4</sub>. Assim, um novo modelo foi gerado excluindo a contribuição dessas interações e mantendo as demais, levando a um melhor ajuste.

Esse novo modelo explicou 95,28% (Tabela 13) da variação da atividade através da alteração dos níveis das variáveis, além de ter apresentado o erro de ajustamento não significativo  $p > 0,1$ .

Analisado o modelo, descreveu-se a notação matemática mais adequada para a atividade enzimática pode ser expressa como:

$$(U.L^{-1}) = 0,290 - 0,124 k + 0,048 l - 0,128 m + 0,114 n + 0,062 o,$$

denotadas as variáveis [C] =k; pH = l; PO<sub>4</sub> = m; [C]\*PO<sub>4</sub> = n e [C]\*pH\*PO<sub>4</sub> = o

O valor médio da atividade enzimática foi menor em comparação com os cultivos utilizando óleo de oliva (Tabela 10), o que está em concordância com os dados observados no delineamento fatorial de níveis mistos do item 4.

Percebeu-se que o efeito de combinação da concentração de carbono e fosfato foi muito mais determinante no nível mais baixo dessa fonte enquanto no nível mais alto, o efeito da combinação sugeriu ser quase nulo (Figura 16).

A melhor condição para a produção de lipase por *M. spathulatha* foi encontrada em pH mais elevado e menor concentração de glicerol como fonte de carbono e menor concentração de fosfato (Figura 15). Os resultados experimentais médios para esse delineamento foram representados na Figura 17.

O resultado da melhora da atividade em função de um menor nível de fonte de carbono foi observado também para o experimento fatorial completo utilizando de óleo de oliva como fonte de carbono (Figura 14) contrapondo o indicado pelo fatorial de níveis mistos, pois, naquele delineamento, o modelo descrevia uma maior atividade enzimática em maiores concentrações da fonte de carbono (Figura 11).

Em otimização utilizando apenas fontes de carbono na produção de lipase de *Rhodotorula mucilaginosa* MTCC-8737, óleo de oliva apresentou os melhores resultados dentre as testadas (Chennupati, et al., 2009). Na otimização de *Geotrichum sp.* uma diferença de apenas 3,0U.mL<sup>-1</sup> foi encontrada entre a melhor fonte de carbono, óleo de soja, para a fonte óleo de oliva (Burkert et al, 2004). Possivelmente os resultados encontrados para *M. spathulatha* R25L270 poderiam ser replicados para outros óleos produzindo baixa mudança nos resultados. Também pode indicar a potencialidade dessa fonte na melhoria da produção de lipases por microrganismos.

Na otimização de cultivo de *Burkholderia multivorans*, percebeu-se que a fonte de carbono óleo de oliva foi significativo depois de uma triagem de variáveis iniciais para a concentração de 3% dessa variável. Para esse microrganismo, o fosfato foi a variável que exerceu o segundo maior efeito sobre a produção de lipases. (Gupta et al., 2007). Para otimização da produção da lipase de *Bacillus pumilus* RK31, óleo de oliva a 1% ao lado de tween 80 0,5% apresentaram os melhores resultados para explicar a variação na produção de lipase. A fonte fosfato teve o maior efeito dentre todas as variáveis para explicar a atividade lipásica em meio com óleo, mas não o pH, que foi excluído no delineamento preliminar de seleção (Kumar et al, 2011). Para *Candida sp.* notou-se que tanto óleo de soja quanto o fosfato apresentaram-se como fatores interferentes na produção de lipase (He, et al., 2006).

Por outro lado, de 12 fatores inicialmente triados para explicar a atividade lipásica, incluindo óleo de oliva, pH e fosfato, a fonte de carbono se mostrou significativa nessa associação em *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021 enquanto as demais (pH e fosfato) não se mostraram determinantes (Teng & Xu, 2008). Na otimização da produção da lipase de *Geobacillus thermoleovorans* CCR11, o óleo de açafraão bastardo e o pH não explicaram a produção de lipase para esse microrganismo e somente a temperatura e sopa nutriente de fontes de nitrogênio orgânicos exerceram a influência desejada (Sánchez-Otero et al., 2011). Em *Geobacillus* sp. ARM verificou-se a importância da fonte de carbono, extrato de levedura e peptona para explicar a produção da enzima, além de íons sódio e cálcio (Ebrahimpour, et al., 2008).

*Bacillus* sp. foi otimizado para produção de lipase frente a diferentes componentes cujo ótimo foi encontrado para glicerol 1%, fosfato 4%, dentre outros componentes, menos pH, que se mostrou não significativo (Gupta et al., 2004).

Nota-se que a regulação da produção de lipases é bastante singular para cada organismo, pela diferença de variáveis indutoras promovendo a produção em distintos microrganismos ainda que seja possível notar que algumas delas que tem maior ocorrência na produção de lipases como óleo de oliva (Burkert et al, 2004; Gupta et al., 2007; Chennupati, et al., 2009) e fosfato inorgânico (He, et al., 2006; Kumar et al, 2011).

#### **4.4. Ensaios de padronização da purificação de lipase**

##### **4.4.1. Padronização da purificação parcial por sulfato de amônio**

Nos ensaios de precipitação de enzimas lipásicas utilizando diferentes concentrações de sulfato de amônio (0 a 100 %) a partir do sobrenadante de cultivo de *Moniliella spathulata* com atividade detectável, percebeu-se que os extratos de 40 e 80% de saturação foram aqueles que produziam maior atividade lipásica quando reagem junto ao substrato sintético pNPP (Figura 18).

Entretanto, na repetição da metodologia não apareceu precipitado para a fração de 40% depois da centrifugação a 14000g sob as mesmas condições executadas anteriormente. Dessa forma, pretendeu-se assegurar o isolamento da primeira fração apresentando atividade, antes recolhida em 40% de saturação utilizando uma faixa de concentração de  $\text{NH}_4\text{SO}_4$  que conteria a enzima de interesse.

Sendo assim, recolheram-se dois extratos de saturação: um primeiro de 0-60% de saturação e um segundo com 80% de saturação e padronizou-se essa metodologia de precipitação como base para as demais purificações.

Os resultados encontrados sugeriram a produção de duas diferentes lipases por *M. spathulata* R25L270, já que existiram dois diferentes extratos apresentando atividade lipásica aumentada, enquanto ela para o mesmo ponto no sobrenadante era muito mais reduzida (Figura 18).

Diversos estudos tem relatado o isolamento de isoenzimas da lipase por meio de precipitação com sulfato de amônio. Entretanto, na utilização dessa estratégia nos trabalhos na literatura, ou não se conseguiu o isolamento dessas duas isoenzimas nessa etapa ou não se desejou isso no estudo em questão. Para *Geotrichum sp.*, atividade lipásica foi observada nas frações correspondentes a saturação de 30 – 60% (Cai et al., 2009). Na precipitação de lipases de *Pseudomonas monteilii* TKU009,

foram isoladas ambas as lipases conjuntamente para a condição de saturação de 30% (Wang et al., 2009). A precipitação empregou concentrações entre 60 – 75% de saturação no isolamento das lipases de *Thermosyntropha lipolytica* (Salameh & Wiegel, 2007). Utilizou-se um gradiente de 60 – 80% de saturação para precipitação das enzimas selvagens e recombinantes de *Rhizopus oligosporus var. microsporus*, resultando no isolamento das lipases em 60% (Iftikhar et al., 2011).

Este perfil de precipitação observado no ensaio pode ser resultante das diferenças das lipases produzidas por *M. spathulata*. Assim, elas podem ter se diferenciado na condição de saturação no isolamento das duas. A provável grande diferença superficial das enzimas de *M. spathulata* pode indicar uma distribuição de cargas em sua superfície, refletindo às suas solubilidades diferenciais. Sendo assim, cada proteína pode ter requerido uma concentração específica para remover sua camada de solvatação para ser precipitada. Possivelmente poderia haver diferenças na glicosilação entre essas enzimas ou distribuição de cargas na suas superfícies. Sabe-se que a solubilidade de uma proteína é em geral aumentada quando glicosilada (Lu et al., 2012; Solá & Griebenow, 2010).

#### **4.4.2. Ensaio de padronização das metodologias de separação pelo rastreamento de atividade das frações eluídas da enzima a partir de cultivo não otimizado**

##### **4.4.2.1. Estratégia inicial.**

Os extratos obtidos da precipitação com 60 ou 80 % de saturação de sulfato de amônio foram analisados por meio de cromatografia de gel filtração em coluna superose 12. Serão mostrados os cromatogramas de um sobrenadante de cultivo cuja atividade foi rastreada cujos resultados possibilitaram a montagem dos fluxogramas de purificação de lipase de *Moniliella spathulata* R25L270 (Figura 6 e Anexo 1).

##### **4.4.2.1.1. Cromatografia de exclusão molecular**

Utilizou-se da técnica de gel filtração inicialmente visto que ela tem sido amplamente utilizada para purificar lipases em 60% dos casos de separação de lipases (Saxena et al., 2003, Saisubramanian et al., 2008). Percebeu-se que ambos os perfis cromatográficos vindos de diferentes extratos de saturação (60 e 80%) do sobrenadante de cultivo de *Moniliella spathulata* em coluna Superose 12 apresentavam picos contendo atividade nas primeiras frações de eluição (Figura 19 e Figura 20). Porém nessa última figura, aparecia também um pico de atividade nas frações 10 e 11.

Os primeiros picos eluídos a partir dos extratos de 60 e 80% de saturação (Figura 19 e Figura 20) sugeriram que a proteína dessas frações possuíam alta massa molecular devido essa metodologia cromatográfica eluir proteínas de maior peso molecular primeiramente. A coluna Superose 12<sup>®</sup> opera sob uma faixa de peso molecular variando desde 1 kDa até aproximadamente 200 kDa em cromatográfica preparativa (SIGMA–ALDRICH). Porém proteínas glicosiladas possuem comportamento anômalo de eluição em coluna Superose 12<sup>®</sup>, pois podem não seguem um padrão de eluição proporcional ao seus pesos moleculares, ainda que o sistema cromatográfico esteja bem padronizado (Lee & Whitaker, 2004). Sendo assim, os resultados sugeriram uma faixa de tamanhos, mas não seriam eficientes para estimar pesos moleculares das proteínas eluídas.

Cogitou-se que a baixa resolução dos picos dos ombros 1-2 e 3-8 para ambas os extratos de saturação pode ter se explicado por existirem interações iônicas das proteínas eluídas com a matriz da coluna. Isso porque foi reportada melhor resolução cromatográfica para coluna Superose 12<sup>®</sup> quando a concentração de sais no tampão atingia níveis superiores a  $0,4\text{mol}^{-1}$  (Lee & Whitaker, 2004), provavelmente porque esses sais competiriam com as interações iônicas da proteína para com a coluna. Assim a concentração de sais no tampão não é considerada pelo fabricante como determinante para afetar a resolução cromatográfica (HEALTHCARE, 2006).

Foram percebidas diferenças nos perfis de eluição das frações de 60% e 80% após a cromatografia em Superose<sup>®</sup> 12, reforçando a hipótese de existirem duas lipases diferentes para *M. spathulata*. Os tempos de eluição dos picos com maior atividade na cromatografia do extrato de 60% surgiram nas frações eluídas 3–9 (Figura 19). Na cromatografia do extrato de 80% essas surgiram picos de atividade nas frações 2–8 e 10-11 (Figura 20).

Analisando a similaridade entre as metodologias dos diferentes extratos inicialmente pelo perfil das proteínas eluídas, notou-se que para ambos os processos de separação, a fração com maior quantidade de proteínas foi a de

número 10-11 (Figuras 19 e 20). Existiu também um pico inicial consensual eluído na fração 2 e 3 nas duas condições. Percebeu-se também que as frações de número 2 e 3 apresentaram atividade para ambos os extratos (Figuras 19 e 20).

As diferenças nos perfis de eluição foram os seguintes. Um pico entre as frações 3-9 não apareceu tão pronunciado na cromatografia do extrato de 80% (Figura 20) quanto no de 60% (Figura 19). Percebeu-se que uma grande atividade

relativa foi detectada no ombro recolhido entre as frações 3–9 na eluição da fração de 60% (Figura 19) que não aparece tão pronunciado na cromatografia da fração de 80% (Figura 20) por sua vez. Além disso o pico da fração 11 com maior quantidade de proteínas eluídas para a fração de 60% (Figura 19) não apresentou atividade frente ao substrato sintético, assim como foi observado na cromatografia da fração de 80% (Figura 20), cujo frasco de mesmo número apresentou a maior atividade enzimática .

Todas as diferenças entre as cromatografias dos extratos de 60% e 80% eluídos através dos dois perfis cromatográficos apontaram novamente para a existência de mais de uma lipase produzida por *Moniliella spathulata* R25L270. Uma primeira forma com alto peso molecular recolhidas nas frações consensuais 2 e 3 das cromatografias dos extratos de 60% (Figura 19) e 80% (Figura 20) de saturação de sulfato de amônio. A segunda forma exclusiva das frações ativas de número 3–9 da cromatografia com o extrato de 60% de saturação (Figura 22). Uma terceira possível lipase presente nas frações de número 10-11 da cromatografia do extrato de 80% de saturação de sulfato de amônio (Figura 20).

Cabe ressaltar que as frações número 2 e 3 dos dois processos cromatográficos poderiam ainda ser duas lipases distintas visto que elas vieram de duas frações de saturação diferentes (Figuras 19 e 20). Além disso, as frações eluídas a partir do extrato de 80% de saturação constituíram o ombro de números 3 a 7 (Figura 20) apresentou dois picos de atividade com um pequeno vale de atividade entre eles, tudo isso em uma região em que as proteínas não estão bem resolvidas entre si. Isso pode ser um indicativo de existir duas lipases para aquela região também.

Em geral as lipases de microrganismos que possuem duas isoformas dessa enzima possuem valores distintos de peso molecular, o que resulta em perfil cromatográfico diferente empregando a técnica de gel filtração. Para as lipases de *Geotrichum* sp SYBC WU–3, houve diferença de 5,3 kDa entre as lipases A (41,1 kDa) e B (35,8 kDa) (Cai et al., 2009). As lipases A e B de *Thermosyntropha lipolytica* diferiam em apenas 7 kDa entre si 50 kDa (lipA) e 57 kDa (lipB) (Salameh & Wiegel, 2007). Similarmente, as lipases A e B de *Candida cylindracea* diferiram em suas massas em apenas 2 kDa, 64 kDa (lipA) e 62 kDa (lipB) (Rúa et al., 1992). As quatro lipases de *Geotrichum candidum* ATCC 34614 (I e II) e CMICC 335426 (a e b) estavam glicosiladas. Suas massas eram de 62, 62, 62 e 58,3 kDa, respectivamente. A glicosilação de suas moléculas conferia um aumento médio de 7,86% na sua estimativa de massa (Sidebottom et al., 1991). Por outro lado, a purificação das lipases de *Pseudomonas monteilii* TKU009, proporcionou o recolhimento de uma



fração insolúvel (lipA), incapaz de ter seu peso estimado, e outra solúvel com 40 kDa (lipB) (Wang et al., 2009).

A partir dos dados da literatura percebeu-se que, em geral, as lipases diferem de peso molecular entre si muito pouco quando são produzidas pelo mesmo microrganismo. O fato de terem sido isoladas frações com atividade lipásica em picos eluídos em tempos bastantes distintos é um indício de que podem existir lipases com diferenças significativas de peso molecular (Figuras 19 e 20). Sobretudo quando se analisam os picos de maior atividade entre as cromatografias dos extratos de 60 e 80%.

#### **4.4.2.1.2.Cromatografia de fase reversa**

A cromatografia de fase reversa foi feita com as frações ativas concentradas do frações da filtração molecular. Primeiramente tomou-se as frações 2 e 3 concentradas e aplicou-as no sistema de separação (Figura 21). Muito embora várias frações tivessem sido retidas na coluna, elas não apresentavam atividade lipásica. Afinal, mesmo utilizando a solução das frações diretamente na reação de atividade sem diluí-las, foram necessárias três horas de reação com o substrato sintético pNPP para uma leitura em espectrofotômetro ser possível. Ainda assim, não existiu satisfatória correlação entre os dados obtidos na cinética nas frações com o perfil cromatográfico, indicando que para a leitura feita nas frações poderia ter ocorrido a degradação (hidrólise) do reagente e não a reação catalisada por enzima.

Na cromatografia das frações 10 e 11 (Figura 22), ainda que na fração eluída percebeu-se uma atividade muitíssimo diminuída, ela se correlacionou bem com o perfil de proteínas nessas frações. Além disso, embora o pico de atividade não estivesse relacionado com a fração que estava interagindo com a coluna (frações 4–11), a técnica conseguia isolar a fração da proteína com atividade das outras frações demais presentes no concentrado (frações 18–29) obtido na cromatografia de gel filtração.

Analisando novamente o cromatograma da Figura 22, cujas frações produzidas na técnica apresentaram atividade somente nas alíquotas iniciais que foram eluídas apenas com a fase A, cogitou-se a possibilidade de moléculas orgânicas presentes no eluente estarem interferindo na atividade da enzima. Possivelmente a acetonitrila (ACN) pudesse apresentar um efeito mais danoso para a atividade da enzima em relação ao ácido trifluoroacético (TFA), refletindo na sua inativação quando a ACN estivesse presente no eluente. Para o pool das frações 2 e 3 eluídos, os efeitos de

TFA e ACN foram igualmente e criticamente importantes para inibir a atividade da enzima.

Além disso, é possível que a razão da lipase não ter sido ligada à coluna de fase reversa para a fração 10 e 11 poderia ser devido que ela estivesse muito glicosilada, pois em geral a glicosilação interfere aumentando o grau de hidrofiliidade das proteínas, também aumentando sua carga líquida negativa e o raio hidrodinâmico das mesmas (Varki et al., 2009). Lipases de *Thermomyces lanuginosus* diferencialmente glicosiladas não tiveram sua capacidade de interagir com superfícies hidrofóbicas mudada, em contrapartida, foi distinta a interação com superfícies hidrofílicas dependendo do tipo de glicosilação (Pinholt et al., 2010). A lipase do mesmo microrganismo quando não glicosilada se associava com maior afinidade a superfície apolar C18 em comparação com uma superfície hidrofílica (Sonesson et al., 2008).

Como o processo cromatográfico por fase reversa envolve a interação simultânea de fases polares e apolares, o comportamento interativo da lipase será dado pela energia livre de interação global: a soma da energia livre das interações hidrofílicas e hidrofóbicas envolvidas (Queiroz et al., 2001). Se as lipases tem suas interações com superfícies hidrofílicas favorecidas essas enzimas poderiam responder similarmente em meios líquidos devido à natureza das interações nesse novo meio poder ser a mesma. Ou seja, quando a proteína estivesse no sistema cromatográfico de fase reversa, ela interagiria fracamente com a fase fixa, adsorvendo-se preferencialmente com a fase móvel demonstrou glicosilação, sendo eluída mais rapidamente.

Algumas lipases tem se comportado de maneira bem distinta em sistemas de fase reversa. Em geral elas se ligam às colunas e são eluídas com valores diferentes de gradiente. A lipase de *R. oryzae* foi eluída em 12% de acetonitrila. A enzima análoga de *Mucor hiemalis f. hiemalis* foi eluída em 9% de acetonitrila, mas para a enzima *Penicillium cyclopium* o gradiente teve de atingir 55% (Hiol et al., 2000).



Decidiu-se por fazer a espectrometria de massas dos picos com atividade recolhidos na fração 4 a 6 da cromatografia de fase reversa da Figura 22, porém somente a fração 6 produziu íons detectáveis. A maior razão massa/carga possuía baixa intensidade. Mesmo assim, seu valor revelava uma massa muito inferior (16.357,5Da) à uma faixa média esperada para uma lipase de 30 a 60 kDa (Figura 23).

Esse resultado novamente foi mais um indício de que as frações testadas possuem conteúdo elevado de glicosilação. Isso porque a matriz mais adequada para ionizar proteínas glicosiladas é aquela contendo o ácido 2,5 dihidroxibenzóico (DHB) (Mank et al., 2004, Hedrich et al., 1993).

#### **4.4.2.1.3. Cromatografia de troca iônica**

A cromatografia de troca iônica foi usada para a separação da lipase de *M. spathulata* R25L270 visto que a maioria dos trabalhos utiliza tanto técnicas de troca aniônica quanto catiônica para isolamento da enzima microbiana (Saxena, et al, 2003). Algumas frações eluídas da gel filtração que poderiam apresentar carga em sua superfície e serem separadas devido a essa característica. As cromatografias seguintes possibilitariam tanto para prever a carga líquida das enzimas quando para promover a separação das mesmas.

##### **4.4.2.1.3.1. Cromatografia de troca aniônica**

Foi recolhido extrato de 80% de saturação de sulfato de amônio e depois concentradas as frações ativas remanescentes na cromatografia de filtração molecular para as amostras serem cromatografadas em troca aniônica. Primeiramente as frações ativas 2, 3 e 4 da gel filtração (Figura 19) foram agrupadas para produzir um extrato que foi injetado na coluna de troca aniônica. Percebe-se pelo perfil de eluição dessas frações uma má interação delas para com a fase fixa coluna (Figura 24), já que toda a fração ativa foi eluída, sugerindo fraca carga líquida positiva nela para interação com a fase fixa em pH 8,0.

Contudo as frações entre 32 e 40 (Figura 24) apresentaram proteínas com satisfatória interação com a coluna e, para a eluição delas, foi necessário um gradiente de 58 a 80% de fase B. Porém essas frações eluídas apresentaram baixa resolução, formando um ombro que não apresentou nenhuma atividade lipásica satisfatória, tanto para a cromatografia do pool de frações 2, 3 e 4 quanto para as frações 10 e 11 (Figura 25).

Os resultados sugeriram que outras proteínas estariam possivelmente agregadas às lipases, pois as cromatografias de troca iônica até então possuem certa

similaridade, apresentando um pico inicial com praticamente toda a proteína injetada no sistema, mesmo quando as frações de origem eram distintas (Figuras 27 e 28). Provavelmente devido à agregação das proteínas, as cargas disponíveis para a interação com a coluna tenham sido poucas, pois as suas partes polares negativas glicosiladas poderiam estar interagindo intensamente entre si e exporiam mais suas porções apolares, embora a proteína estivesse solúvel. Assim as enzimas agregadas estariam pouco interativas com a fase fixa da coluna devido a possível carência de grupos carregados expostos. Essa hipótese estaria apoiada no fato de que a resolução das cromatografias de fase reversa (Figuras 24 e 25) foram bem mais elevadas do que na cromatografia de troca iônica.

Cogitou-se, também, que as proteínas eluídas no sistema de troca iônica poderiam também estar agregadas através da sua forte interação de suas partes polares e glicosiladas. Como a proteína estava solúvel, os grupos expostos da lipase e das outras possíveis proteínas agregadas poderiam apresentar uma carga líquida positiva também, inibindo a interação com a coluna.



Analisando a purificação no sistema de troca aniônica sob a ótica inversa, ou seja, a ligação de proteínas indesejadas no sistema de purificação e a eluição das proteínas desejadas, existiria da mesma forma a purificação. Porém percebeu-se pelos cromatogramas que a quantidade de proteína retida na coluna variou significativamente para as os dois pools de atividade eluídos 2, 3 e 4 ou 10 e 11 (Figuras 27 e 28). A resolução da técnica se mostrou baixa visto que quase nenhuma ou poucas frações protéicas interagiram com a coluna, gerando um pico que pode conter muitas impurezas. Sendo assim, uma nova metodologia de purificação para ser testada se fazia necessária e executou-se a troca catiônica.

#### **4.4.2.1.3.2. Cromatografia de troca catiônica**

Foi feito um teste com o pool de frações ativas (3 a 7) advindo da cromatografia de gel filtração do extrato de 60% de saturação (Figura 19). Percebeu-se um perfil de eluição distinto das cromatografias em troca aniônica, sobretudo porque foram isoladas duas frações distintas com atividade enzimática por essa técnica (Figura 26).

Se observou um pico inicial eluído apenas com a fase A, seguido da eluição de um pico com atividade enzimática no início do gradiente (Figura 26). A partir desses dados, pode-se supor que exista um agregado inicial proteico contendo uma lipase ativa que não exibe carga líquida suficiente para interagir com a coluna (frações 1-3) e uma segunda fração com lipase contendo carga positiva que interage com a coluna (frações 13-19). Essas frações poderiam também estar agregadas com outras proteínas, culminando com uma fraca interação delas com a coluna, visto que a resolução do pico de atividade ficou comprometida (Figura 26).

A ligação parcial da enzima com atividade na coluna em um sistema cromatográfico de troca catiônica reforça as suposições sobre a natureza superficial positiva da enzima. Mas também reforça a suposição de que a enzima possuía um número reduzido de cargas em sua superfície, pois foi necessário um gradiente sutil (5 – 20%) da fase B para provocar sua desorção da coluna cromatográfica.

#### **4.4.3. Purificação da lipase pela estratégia 2 e identificação da influência das fontes de carbono no meio de cultivo sobre padrão de produção de lipases por *M. spathulata* R25L270.**

Os resultados mostrados foram os gerados a partir da purificação da lipase utilizando os passos anteriormente testados que produziram os melhores resultados: cromatografia de gel filtração seguida de cromatografia de troca iônica, mas





também a etapa adicional de afinidade deveria ainda ser testada.

Também foi feita essa purificação a partir de dois sobrenadantes de cultivo distintos. Um utilizando de fonte de carbono óleo de oliva e outro empregando glicerol (item 2.3). Nessa estratégia a etapa de precipitação por sulfato de amônio gerou resultados similares aos já reportados e os dados não foram mostrados.

#### **4.4.3.1. Cromatografias de gel filtração e identificação da influência das fontes de carbono no meio de cultivo sobre padrão de produção de lipases por *M. spathulata* R25L270.**

Na repetição da metodologia de gel filtração, quando se recolheu e purificou os sobrenadantes de cultivo da cultura de *M. spathulata* R25L270 crescido em meio contendo ou glicerol ou óleo de oliva, observou-se distinção no comportamento das frações eluídas para cada fração de saturação. Notou-se que o perfil de eluição das proteínas seguia a mesma tendência geral para todas as cromatografias como foi observado nas Figuras 19 e 20, independentemente da fonte de carbono ou extrato com fração de saturação (Figuras 27, 28, 29 e 30).

O primeiro cultivo fora feito utilizando-se de óleo de oliva como fonte de carbono (Figuras 19 e 20). Comparando as duas cromatografias feitas sob a mesma condição – extrato de 60% de saturação de sulfato de amônio de um cultivo de óleo de oliva - (Figuras 19 e 28), se percebeu uma satisfatória reprodutibilidade da técnica em termos qualitativos, pois os picos de atividade foram eluídos nas frações iniciais juntos a um ombro inicial nas duas técnicas.

Comparando a cromatografia da fração de 80% da primeira padronização com a segunda tentativa notou-se também similaridade na repetição da técnica (Figuras 20 e 30). Entretanto o pico que apresentou maior atividade na primeira cromatografia foi aquele com frações recolhidas próximas as de número 10 e 11 (Figura 20). Nessa nova tentativa, percebeu-se que o pico recolhido no pool de frações de números 3 a 7 foi mais ativo do que as frações recolhidas nos picos 10 e 11 (Figura 20).

Porém foi percebido que na cromatografia da repetição do método da fração de saturação de 60% (Figura 28), ocorreu uma diminuição da resolução da coluna devido o contorno dos picos das frações recolhidas, sobretudo para a região das frações ativas 2-4 não apresentarem picos bem definidos. A cromatografia do extrato de 80% do meio de cultura contendo óleo de oliva como fonte de carbono (Figura 30) também apresentou menor resolução comparando com a primeira tentativa (Figura 20). As principais mudanças foram o desaparecimento do pico na fração 2 da segunda

tentativa, o aumento da intensidade do ombro de números 3 a 7 e o desaparecimento dos picos da fração 11 (Figura 30). Isso sugeriu que a proteína poderia estar efetivamente se ligando de forma irreversível à coluna devido à carência de sal no tampão de eluição, bloqueando os sítios de interação na fase fixa e prejudicando assim sua capacidade de resolução.

Também puderam ser observadas interessantes diferenças do perfil de produção de uma mesma fração de saturação quando ela adviesse ou de glicerol ou de óleo de oliva. Notou-se um aparente aumento relativo de produção da lipase recolhida nas frações 10 e 11 para as frações advindas do cultivo com glicerol em comparação com óleo de oliva em ambos os extratos de saturação (Figura 27 e Figura 29). Notou-se que os cultivos em fonte de carbono óleo de oliva, para os dois extratos de saturação, possibilitaram o recolhimento das frações mais ativas junto a um ombro das frações 2 a 7 (Figura 28 e Figura 30).

Essa tendência em particular pode refletir o efeito que a fonte de carbono exerce na produção da lipase. Supos-se existir diferentes promotores de lipase induzidos por óleo de oliva ou glicerol no microrganismo de forma que, quando essas fontes de carbono estivessem presentes ou ausentes, seria variada a intensidade dos transcritos que originariam as lipases, repercutindo no diferencial perfil cromatográfico das amostras purificadas.

#### **4.4.3.2. Cromatografias de troca aniônica**

Segundo o fluxograma de trabalho (Anexo 1), submeteram-se as amostras purificadas em gel filtração para uma nova técnica já previamente testada na tentativa de isolamento das possíveis diferentes lipases produzidas. As frações purificadas na cromatografia de gel filtração, foram separadas nas suas frações 2 e 3, constituindo o primeiro pool de atividade; as frações 4, 5 e 6, constituindo o segundo pool de atividade e o terceiro foi constituído pelas frações agrupadas 10 e 11. Como haviam 2 frações ativas obtidas na precipitação que poderiam vir de cultivo com duas fontes de carbono distintas, foram feitas  $2 \times 2 \times 3 = 12$  corridas em troca iônica.

Foi possível recolher frações ativas derivadas da técnica de gel filtração como aquelas obtidas em 60% de saturação de sulfato de amônio e um segundo grupo obtido em 80%. Observou-se inicialmente que todos os pools obtidos através da precipitação em 80% de saturação perderam praticamente





toda sua atividade enzimática (Figura 31). Isso indicou novamente a existência de duas diferentes lipases produzidas por esse microrganismo.

Em contrapartida, as frações concentradas a partir do extrato de 60% de saturação que ainda possuíam atividade foram aplicadas na coluna de troca iônica e geraram outras frações que não responderam bem à estratégia de purificação. Nenhum pico foi retido na coluna para todos os pools testados para essa fração de saturação (Figura 32).

Analisando quantitativamente os resultados produzidos por essa estratégia experimental (Tabela 14), observou-se que inicialmente o meio contendo glicerol, embora tenha uma atividade por volume de sobrenadante menor do que a do óleo de oliva possui maior atividade específica do que o sobrenadante de cultivo contendo o óleo. Isso particularmente é bastante interessante visto que utilizando de resíduo contendo glicerol como fonte de carbono para produzir lipase ao invés de óleo de oliva essa produção poderá requerer menores etapas de purificação para a obtenção da enzima.

Esse fato reforça o uso de *Moniliella spathulata* R25L270 como organismo fonte de lipase visto que ele possivelmente poderia não somente utilizar um resíduo industrial para produzir o catalisador lipolítico que retornaria no processo, reduzindo o custo final de operação, mas também poderia produzir o bioproduto mais puro do que utilizando a fonte de carbono mais cara, nesse caso o óleo, barateando o processo mais uma vez.

Notou-se também que de modo geral o rendimento médio das purificações foi extremamente baixo ( $\bar{x}= 13,4\%$ ) (Tabela 14). A cromatografia de troca iônica não apresentou um perfil de eluição interessante, através da falta de ligação de algumas proteínas junto à coluna, liberando um pool de lipases ativa em basicamente uma fração, refletindo em um baixo fator médio de purificação ( $\bar{x}=5,67$ ) (Tabela 14).

#### **4.4.3.3.Cromatografias de afinidade**

Percebeu-se que a atividade total das frações que continham lipases da técnica de troca iônica que também vieram de um sobrenadante de cultivo utilizando de óleo de oliva como fonte de carbono já era bastante baixa depois de etapa de purificação ( $\bar{x}= 2,92 \text{ U.L}^{-1}$ ). Portanto, como a atividade total seguia uma tendência geral de queda, sem apresentar etapas com rendimento de purificação significativos, decidiu-se não testar essas amostras com atividade baixa em uma nova etapa de



**Tabela 14 – Tabela de Rendimento de purificação do planejamento de purificação do fluxograma do Anexo 1**

	<b>G</b>						<b>O</b>					
Atividade (U.L <sup>-1</sup> )	37,834						250,620					
Dosagem (mg/mL)	258						314					
Atividade normalizada (U.g <sup>-1</sup> )	0,1						0,8					
	<b>GN6</b>			<b>GN8</b>			<b>ON6</b>			<b>ON8</b>		
Atividade (U.L <sup>-1</sup> )	64,792			78,496			68,906			97,449		
Dosagem (mg/mL)	61			276			183			214		
Atividade normalizada (U.g <sup>-1</sup> )	1,1			0,3			0,4			0,5		
Fator de purificação	11			3			0,5			0,6		
Rendimento atv. (%)	171,3			207,5			27,5			38,9		
	<b>GN6F1</b>	<b>GN6F2</b>	<b>GN6F3</b>	<b>GN8F1</b>	<b>GN8F2</b>	<b>GN8F3</b>	<b>ON6F1</b>	<b>ON6F2</b>	<b>ON6F3</b>	<b>ON8F1</b>	<b>ON8F2</b>	<b>ON8F3</b>
Atividade (U.L <sup>-1</sup> )	16,942	22,759	5,306	33,036	24,477	2,415	2,396	4,660	1,560	2,625	4,564	1,731
Dosagem (mg/mL)	9,7	23,0	37,7	8,0	17,0	42,3	6,0	13,4	44,2	4,6	10,4	40,6
Atividade normalizada (U.g <sup>-1</sup> )	0,024	0,031	0,013	0,089	0,019	0,005	0,027	0,013	0,004	0,035	0,017	0,004
Fator de purificação	0,02	0,03	0,01	0,31	0,07	0,02	0,07	0,03	0,01	0,08	0,04	0,01
Rendimento atv. (%)	26,149	35,126	8,190	42,087	31,182	3,077	3,478	6,762	2,263	2,693	4,684	1,776
	<b>GN6F1</b>	<b>GN6F2</b>	<b>GN6F3</b>	<b>GN8F1</b>	<b>GN8F2</b>	<b>GN8F3</b>	<b>ON6F1</b>	<b>ON6F2</b>	<b>ON6F3</b>	<b>ON8F1</b>	<b>ON8F2</b>	<b>ON8F3</b>
	<b>T1*</b>	<b>T1*</b>	<b>T1*</b>	<b>T1*</b>	<b>T1*</b>	<b>T1*</b>	<b>T1*</b>	<b>T1*</b>	<b>T1*</b>	<b>T1*</b>	<b>T1*</b>	<b>T1*</b>
Atividade (U.L <sup>-1</sup> )	2,339	7,075	4,812	7,113	3,195	1,967	1,633	1,700	1,567	1,600	1,767	1,603
Dosagem (mg/mL)	2,7	9,1	15,8	3,9	14,6	37,4	2,9	7,1	37,4	0,8	4,6	31,1
Atividade normalizada (U.g <sup>-1</sup> )	0,635	0,251	0,034	0,843	0,168	0,006	0,082	0,065	0,004	0,350	0,100	0,006
Fator de purificação	26,37	10,40	1,39	9,44	1,88	0,07	3,00	2,39	0,15	10,02	2,85	0,16
Rendimento atv. (%)	13,81	31,09	90,68	21,53	13,05	81,42	68,16	36,48	100,46	60,96	38,71	92,65

**Legenda: N = precipitação por sulfato de amônio; 6= fração de 60% de saturação; 8= fração de 80% de saturação; F = cromatografia de gel filtração; 1 = 1º pool de atividades (frações 2 e 3); 2 = 2º pool de atividades (frações 4 a 7); 3 = 3º pool de atividades (frações 10 e 11); T = Cromatografia de Troca Iônica; 1\* = único pool de atividades da troca iônica.**

purificação. Em contrapartida, tomaram-se apenas três amostras para testar a cromatografia de afinidade (GN6F1T1; GN6F2T1 e GN6F3T1) para verificar o comportamento dessas amostras frente uma nova técnica de purificação (Anexo 1).

Foram recolhidas e concentradas as frações dos pools com atividade que passaram pela técnica da troca iônica individualmente que foram isolados a partir do extrato do sobrenadante de cultivo com glicerol com 60% de saturação, pois depois da cromatografia de troca iônica elas apresentavam atividades totais possíveis de serem detectadas em três pools distintos. Resolveu-se aplicar os pools em coluna de afinidade por heparina devido à técnica ter se mostrado útil na separação de algumas lipases e outras enzimas correlacionadas (Farooqui et al., 1998). Entretanto aqui, as amostras não possuiriam nome específico.

A heparina é um glicosaminoglicano e um polímero altamente sulfatado, possuindo uma carga líquida negativa extremamente grande o que confere a essa substância capacidade de interagir fortemente com várias outras macromoléculas. O mecanismo de interação proposto para sua interação pode ser de duas formas: ligação com cargas positivas em modo cooperativo ou ligação específica, por exemplo, com antitrombina III (Farooqui et al., 1998).

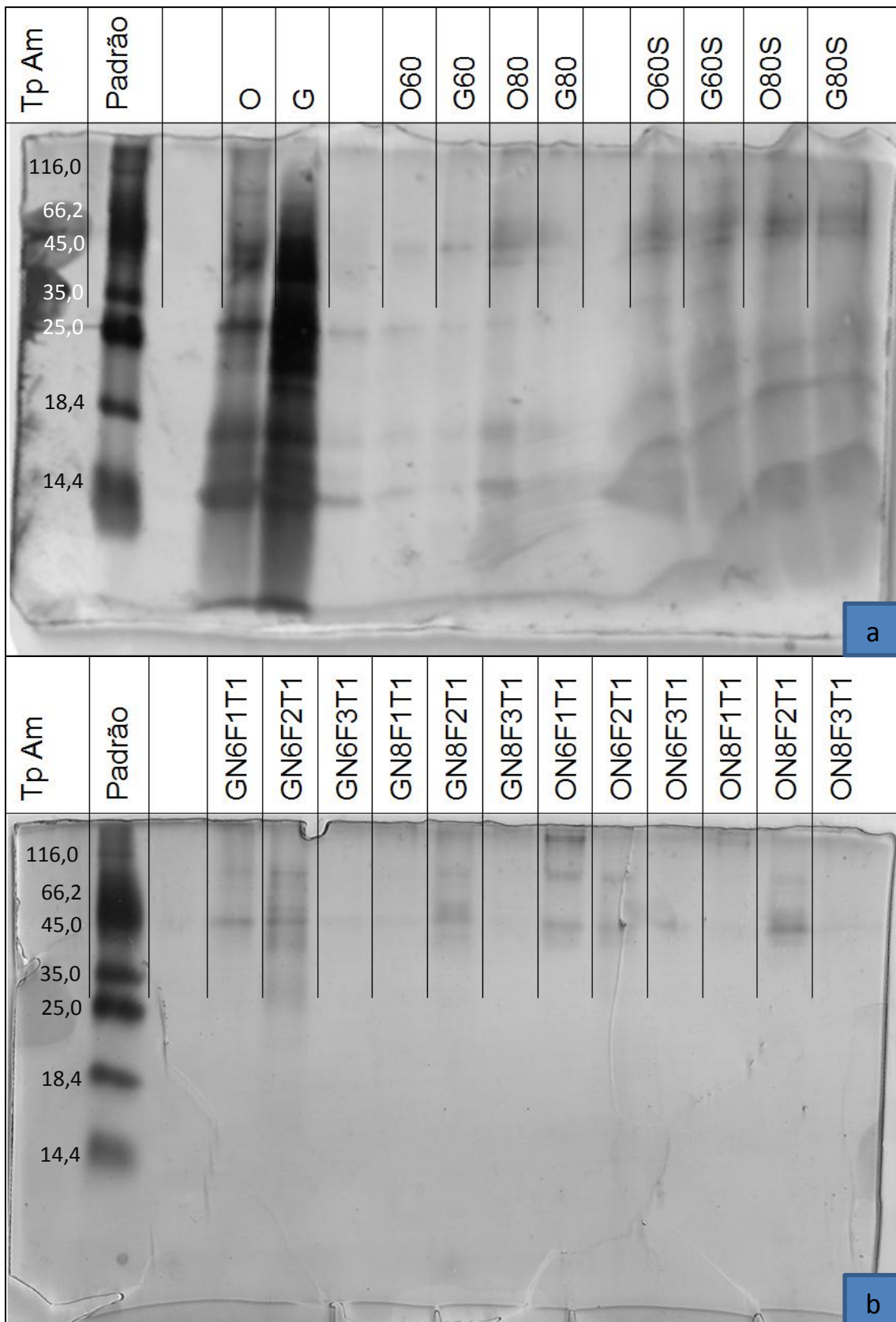
As primeiras amostras testadas (GN6F1T1; GN6F2T1), se ligaram parcialmente na coluna (Figura 33). Como o mecanismo de interação da heparina não é somente específico de afinidade, forças de natureza iônica das partículas podem também ter desempenhado papel interessante no estabelecimento das interações da proteína para com a fase fixa. A lipase poderia estar glicosilada a apresentando grande carga líquida negativa, exibindo agrupamentos não interativos com uma superfície também negativa ou específica da heparina, o que explicaria a atividade ter sido detectada pelas proteínas eluídas nos primeiros picos (Figuras 33 e 34). Inversamente, as proteínas interativas com a fase fixa contidas nos picos recolhidos em gel filtração nas frações de 2 a 7 podem ter carga líquida positiva (Figura 34). Na Figura 38a foram percebidas grandes quantidades de proteínas nas amostras G e O e nos pellets O60, G60, O80 e G80, e que não existem proteínas de peso molecular na Figura 38b, depois de feita a gel filtração e troca iônica nas amostras contendo atividade. Esses dados corroboram a hipótese de agregação da lipase, juntos da Figura 35.

A média de peso molecular encontrada na Figura 35b é bem mais alta do que se encontra para uma lipase (Sharma et al., 2001) sugerindo a agregação da lipase. Também o arraste da fração GN6F2T1\* na mesma Figura pode sugerir que uma da









**Figura 35 - Eletroforese das frações com atividade lipásica.** (a) frações de sobrenadante de cultivo e da precipitação por sulfato de amônio sendo os sobrenadantes com sufixo S e pellets sem sufixo. (b) frações recolhidas depois da cromatografia de troca iônica. Gel desnaturante 12,5% contendo SDS e corrido a 120V. Coloração por prata.

bandas que representam o agregado pode ter se decomposto em frações menores durante o processo da eletroforese, exibindo o padrão de arraste.

#### **4.4.3.1. Cromatografia de fase reversa: Estudo do efeito de diferentes solventes orgânicos na atividade lipásica para escolha da fase móvel da cromatografia de fase reversa**

Devido à técnica de cromatografia de afinidade não ter sido bem sucedida para purificar a lipase, já que ela não isolou frações bem resolvidas decidiu-se por retirá-la da série experimental e tentar utilizar de outras metodologias para o isolamento da biomolécula.

Sendo assim, resolveu-se investigar outros solventes para purificar a fração obtida na cromatografia de gel filtração pela cromatografia de fase reversa para que não existisse inativação da enzima. Nesse estudo observou-se o extremo efeito deletério exercido na atividade lipásica pela acetonitrila explicando os resultados das cromatografias iniciais utilizando esse solvente no tampão B (Figura 21 e 22).

Ainda assim, quando se utilizou o metanol (Figura 36, em vermelho) para uma nova tentativa de purificação nas mesmas condições anteriores, os resultados não foram satisfatórios também (dados não mostrados). A escolha do metanol foi devida a impossibilidade do emprego do DMSO devido à sua elevada viscosidade.

Esses resultados já apontam as lipases de *M. spathulatha*, como sensíveis a solventes orgânicos. Como a adição dos solventes testados na Figura 36 junto à lipase foi feita em uma única etapa e a concentração final foi bastante elevada, provavelmente a enzima pode ainda ser parcialmente resistente a solventes orgânicos, porém não em condições em que foram testadas. Devido à adição de solvente orgânico em uma única etapa já ter sido reportada como nociva para a lipase em termos de atividade, se faz a adição do solvente no meio catalítico em etapas em reatores (Tan et al., 2010; Nie et al., 2006). Embora esse tenha sido um estudo de estabilidade preliminar com o intuito de melhorar a purificação da enzima, percebeu-se pelos resultados alcançados que é merecida uma abordagem sobre os efeitos inibitórios dos solventes orgânicos sobre a enzima, tanto para ajudar caracterização da enzima, mas também para a purificação da mesma.

O estudo da estabilidade sobre a enzima pura de *Rhizopus oryzae* revelou que o metanol foi aquele solvente (30%, 1h) dentre 13 que proporcionou os valores de atividade mais baixos (Hiol, et al., 2000). Para lipase de *Cryptococcus sp.* o benzeno sobrepôs o efeito inibitório do metanol sobre esse catalizador, depletando a atividade

da enzima na concentração de 10%. Para a mesma enzima, o DMSO apresentou efeitos de aumento na atividade (Kamini et al., 2000).

#### **4.4.4. Separação por ultrafiltração**

Como as metodologias cromatográficas não foram bem sucedidas para a purificação da lipase, estudou-se a eficiência do sistema de filtração molecular para a purificação. A partir do extrato precipitado, ressuspendido e ultrafiltrado, percebeu-se que as amostras retidas no sistema de ultrafiltração foram as únicas que apresentaram atividade (Figura 37), mostrando que a lipase tem maior peso molecular do que 10 kDa. Os dados vão de encontro com a literatura que reporta valores médios de peso molecular esperados para lipase de 30-50kDa (Sharma et al., 2001). Os dados também estão de acordo com os resultados observados na eletroforese (Figura 35).

Levando em consideração todas as estratégias adotadas até então, percebeu-se que aquelas em que se obteve maior sucesso na separação de diferentes frações de lipase contendo atividade foram: a precipitação de sulfato de amônio, a ultrafiltração e cromatografia de gel filtração. Sendo assim, a fim de se purificar a enzima para proceder a caracterização parcial das diferentes frações isoladas, decidiu-se combinar as estratégias nesta ordem apresentada.

#### **4.4.5. Purificação parcial das lipases através das técnicas padronizadas mais efetivas.**

Para a purificação final da enzima a partir de um novo cultivo de *M. spathulata* R25L270 em óleo de oliva deixou-se a etapa cromatográfica como a última metodologia. Durante a execução dessa etapa, ocorreu a mudança das condições experimentais. Na disponibilidade da ultracentrífuga para fazer o isolamento da fração precipitada pretendeu-se aumentar a força empregada na amostra para recolher a fração não recolhida à mais baixa rotação até então. Percebeu-se na execução dessa etapa que devido a isso o perfil das proteínas na cromatografia foi alterado (Figura 38).

Inicialmente percebeu-se que a cromatografia do extrato de 60% teve suas frações iniciais mais convoluidas, com menor resolução dos picos (Figura 38a). A purificação do extrato de 80% apresentou o ombro relativo às frações 3 a 7 muito aumentados (Figura 38b) em relação às outras cromatografias anteriores (Figuras 22–23; 32–33). Percebeu-se também a sobreposição das frações ativas com o cromatograma ficou bastante prejudicada.

Notou-se, que os picos de atividade não ficaram bem resolvidos, sobretudo para a fração de 80%. Então os picos de atividade mais elevada 9, 10, 11 e 12 foram

reunidos para a caracterização parcial. Também as frações 2 e 3 obtida a partir da precipitação inicial a 60% de saturação foram agrupadas para serem caracterizadas. Provavelmente esse efeito pode ter acontecido devido a uma agregação na coluna que ocorrera pela falta de sal no tampão de eluição (Healthcare, 2006).

Notou-se que o rendimento das metodologias para purificar as lipases das frações de 60 e 80% foram bastante similares, exceto para a etapa de filtração com amicon Tabela 15. Possivelmente a lipase fora inativada pela metodologia adotada.



Percebeu-se também que a purificação da amostra com 60% de saturação foi muito mais efetiva para a enzima dessa fração do que para a sua análoga de 80%, pois o fator de purificação foi superior para todas as etapas de purificação para essa fração quando em comparação com a outra.

A combinação de precipitação por sulfato de amônio e cromatografia de gel filtração proporcionou rendimento de 22% para a lipase de *Pythium ultimum* 144 (Mozaffar & Wette, 1993). As duas lipases de *Candida cylindracea* foram extraídas conjuntamente do meio de cultura através de precipitação com etanol apresentando 84% de rendimento (Rúa, et al., 1993). A lipase de *Rhizopus oryzae* foi purificada com rendimento de 80% (Hiol et al., 2000). Esses últimos valores são mais próximos dos encontrados para ambas as frações isoladas de *M. spathulata*.

A eletroforese das frações purificadas foi alterada para permitir maior visualização daquelas de maior massa molecular. Pela Figura 39 foi possível notar que não existiu mudança no padrão de proteínas dentro de uma mesma fração de saturação quando a amostra foi purificada através das técnicas empregadas. Notou-se também que o extrato de 80% de saturação possui bandas bastantes distintas do extrato de 60%, sugerindo que possa haver de fato a presença de diferentes lipases em cada um dos extratos. Porém, existiu uma banda consensual para frações advindas de ambos extratos de peso molecular ~55-60KDa, sugerindo esse como o peso molecular da lipase em cada fração.

As técnicas empregadas para purificação parcial de cada um dos extratos de *Moniliella spathulata*, estão presentes como as mais comumente encontradas em trabalho de revisão de purificação de lipases (Saxena et al., 2003, Sharma et al., 2001). A precipitação por sulfato de amônio é metodologia utilizada em mais de 40% dos casos como estratégia de concentração dessas proteínas (Saxena et al., 2003). Dentre as técnicas cromatográficas aquela que demonstrou maior eficiência, gel filtração, aparece como a mais utilizada em metodologias de purificação para 60% dos casos (Sharma et al., 2001).

Em metodologia utilizando de precipitação por sulfato de amônio e gel filtração, a lipase de *Bacillus stearothermophilus* AB-1 foi purificada parcialmente utilizando 60% de saturação no sobrenadante para isolar a enzima, resultado similar ao encontrado nesse trabalho (Abada, 2008). Para a purificação de lipase de *Pseudomonas*, foi utilizada a precipitação por sulfato de amônio a 60% de saturação para isolar a enzima com rendimento de 59%, cujo resultado foi melhorado para 83% empregando antiespumante Silicone 21 (Kanwar, et al., 2002).



Combinando precipitação em sulfato de amônio e cromatografia de troca iônica em coluna DEAE celulose, a lipase de *Microbacterium luteolum* foi parcialmente purificada 35,64 vezes com rendimento de 3,0%. O rendimento da etapa de precipitação alcançou 5,47% (Joseph, et al, 2012).

O emprego da metodologia de precipitação em sulfato de amônio e cromatografia de troca iônica em coluna DEAE celulose-32 para purificação de diferentes lipases de *Geotrichum* sp. SYBC WU-3 proporcionou rendimento de 20,4% para lipase A e 9,2% para lipase B (Cai, et al., 2009).

**Tabela 15– Rendimentos da purificação parcial padronizada de lipase a partir do cultivo com óleo de oliva**

. Analisaram-se os dados quanto ao valor da diferença entre os níveis de uma variável em termos da atividade comparando com as demais variáveis. Quando a diferença produzida pela variação dos níveis da variável estudada na atividade enzimática da levedura era a menor entre todas as outras, essa variável deveria ser a escolhida para deixar o delineamento.

Os níveis das variáveis no tratamento em que foi observada maior atividade enzimática, frasco 8 (Anexo 3), dentre os dias do cultivo sétimo dia, correspondem com os níveis de mais elevadas médias da

Tabela 4 – Resultados de atividade, densidade ótica, dosagem protéica e atividade normalizada por proteína para os diferentes tratamentos do delineamento de níveis mistos L18.

<b>Tratamento</b>	<b>Atividade Lipásica (U.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>DO (<math>\lambda_{600nm}</math>)</b>	<b>Dosagem proteica (mg/L)</b>	<b>Atividade específica (U/mg)</b>
1	3,027	0,09	1263	0,002397
2	10,559	0,37	1764	0,005984
3	2,609	0,17	1430	0,001825
4	1,468	0,24	1397	0,001051
5	0,859	0,54	1804	0,000476
6	6,299	2,00	1203	0,005235
7	0,555	-0,05	717	0,000775
8	88,802	1,53	3769	0,023562
9	0,384	-0,02	2973	0,000129
10	17,044	10,22	7233	0,002356
11	0,422	-0,05	2724	0,000155
12	0,555	0,31	2240	0,000248
13	71,723	5,52	1987	0,036102
14	24,918	3,03	1707	0,014601
15	2,669	0,63	1698	0,001572
16	67,657	5,90	1942	0,034835
17	1,164	0,26	1587	0,000734
18	44,165	1,56	2271	0,019447

A partir desse pressuposto, observando a Tabela 6, percebeu-se que o valor de predição da resposta pelas variáveis experimentais testadas  $r^2 = 67,5\%$ , sugere que possa existir outras variáveis influenciando na resposta alcançada. Ainda assim percebeu-se que esse valor de coeficiente era minimamente satisfatório para rejeição de ao menos “Sal KPO<sub>4</sub>” e “[N]” devido aos seus elevados valores p preditos (Figura 9).

Porém, para a exclusão da variável que menos explicasse a variação na atividade enzimática para o sétimo dia, excluiu-se a variável menos significativa e manteve-se as demais. Sendo assim, foram consideradas significativas as variáveis “fonte C”; “[C]”, “fonte N”, “sal KPO<sub>4</sub>” e “pH”. Para um segundo experimento de otimização de deslocamento ascendente, decidiu-se por retestar essas variáveis.

Diversas das variáveis já escolhidas para o próximo passo de otimização poderiam não ter sido selecionadas caso a decisão para suas seleções fosse feita a partir do modelo predito, já que várias delas, pelo modelo, não se mostravam significativas (Figura 9). Isso ocorreria caso fossem excluídas as variáveis “fonte C”; “sal KPO<sub>4</sub>” e “pH” para ir para a próxima etapa de otimização.

Sendo assim, preferiu-se decidir eliminar a variável menos significativa indicada pelo modelo “[N]” e continuar a testar aquelas outras indicadas pelo modelo como não significativas “fonte C”; “sal KPO<sub>4</sub>” e “pH” devido o ajuste do modelo predito não ter sido muito alto. Também percebeu-se que mais valia continuar testando uma variável não

**Tabela 6 – Efeito das variáveis sobre a médias das atividades (U.L<sup>-1</sup>). O nível de confiança foi de 90% (p<0,1)**

<b>Termo</b>	<b>Coeficiente</b>	<b>EP(calc)</b>	<b>T</b>	<b>p</b>
Constante	20,84	5,65	3,69	0,006
Fonte C 1	-7,75	5,55	-1,40	0,200
[C] 1	-13,1	5,55	-2,35	0,046
Fonte N 1	-16,1	7,70	-2,09	0,070
Fonte N 2	18,4	8,54	2,15	0,063
[N] 1	-0,634	5,55	-0,11	0,912
Sal KPO4 1	-1,62	5,55	-0,29	0,778
pH 1	-9,90	5,55	-1,79	0,112
$s^2 = 22,18$				
$r^2 = 67,5\%$				
<b>EP(calc) = erro padrão calculado; T = valor T calculado; P = valor p calculado para a variável; s<sup>2</sup>= variância</b>				

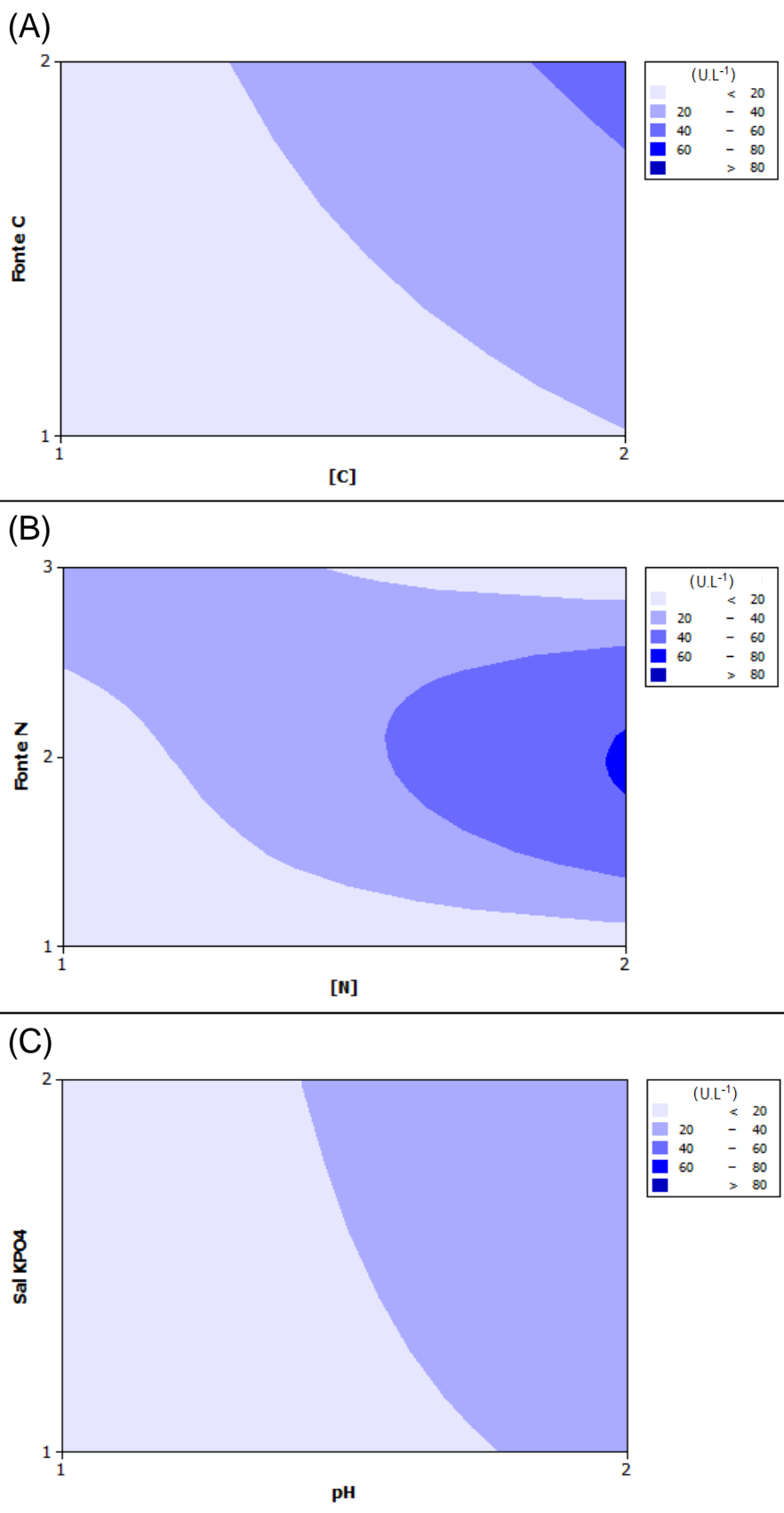
significativa cometendo erro do tipo I do que correr o risco de eliminar do planejamento fatorial uma variável significativa (erro do tipo II) o que constituiria um grande equívoco.

O modelo descrito para os dados estudados pôde ser descrito pelas variáveis significativas mostradas na Tabela 6. Denotando  $[C] = a$ ; Fonte N  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = b$ ; Fonte N  $\text{NaNO}_3 = c$ ; e a constante com seu valor nominal, proporcionou:

$$\text{Atividade } (U.L^{-1}) = 20,8 - 13,1 a - 16,1 b - 18,4 c$$

Uma demonstração gráfica dos efeitos causados pelas variáveis testadas na atividade enzimática é possível pelos gráficos de efeito (Figura 10). Eles mostraram menor contribuição das variáveis “Fonte N”; “Sal  $\text{KPO}_4$ ” e “pH” para explicar a atividade enzimática. Para as variáveis “Sal  $\text{KPO}_4$ ” e “pH”, houve baixa correlação entre a mudança de seus níveis refletindo na alteração na atividade enzimática (gráfico C), efeito mais pronunciado nos gráficos A e B da Figura 10. Para o gráfico B, percebeu-se de que a variável concentração da fonte de nitrogênio pode ter efeito de segunda ordem quando analisada em uma combinação com a fonte de nitrogênio nitrato de sódio empregada. Isso, porém, não é visto para as fontes 1 e 3 ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e Uréia), possivelmente porque essas fontes não interferem incentivando a produção global de lipase. Portanto a atividade enzimática não sofre alteração na presença delas.

No estudo de fatorial de níveis mistos L18 de *M. spathulata* R25L270 também foi analisado o efeito das variáveis na densidade ótica (DO) para o sétimo dia de



**Figura 10 – Curva de contorno da influência das variáveis de estudo na atividade enzimática.** (A)= Fonte de carbono versus concentração da fonte de carbono; (B)= Fonte de nitrogênio versus concentração da fonte de nitrogênio; (C)= fosfato de potássio versus pH.

cultivo. Nessa análise, notou-se um perfil de resultados bastante distinto daquele obtido para as atividades. Percebeu-se pelo gráfico mudanças nos perfis de influência das variáveis “[N]” e “pH” (Figura 11) sobre a densidade ótica. Na análise anterior percebeu-se maiores atividade enzimática quanto maiores foram os níveis dessas variáveis. Percebeu-se também maior significância estatística do fosfato de potássio para explicar a resposta para densidade ótica (DO).

Ainda que existiram variações na densidade ótica representadas pelos gráficos (Figura 11), nenhuma das variáveis explicaram a densidade celular do cultivo devido ao  $p > 0,1$  (Tabela 7).

Apenas a constante do modelo ajustado explicaria a densidade ótica ( $p$ -valor= 0,018) uma vez que nenhum dos parâmetros estudados influenciou a DO do meio. Dessa forma, o modelo que melhor se ajustou à densidade ótica para o sétimo dia de cultivo foi expresso por:

$$\text{Densidade Ótica } (DO_{\lambda 600nm}) = 1,91$$

A predição das variáveis que influenciam a dosagem pelo modelo mostrou que somente a variável concentração da fonte de carbono influenciava significativamente a produção protéica como mostrou a Tabela 8.

**Tabela 8 - Efeito das variáveis sobre a médias para médias das dosagens protéicas ( $\mu\text{g/mL}$ ). O nível de confiança foi de 90% ( $p < 0,1$ ).**

Termo	Coeficiente	Coef. erro	T	p
Constante	2204	315,1	6,996	0
Fonte C 1	-429,9	309,5	-1,389	0,202
[C] 1	-604,8	309,5	-1,954	0,086
Fonte N 1	-727,5	429,5	-1,694	0,129

Fonte N 2	-344,0	476,4	-0,722	0,491
[N] 1	444,9	309,5	1,438	0,188
Sal KPO <sub>4</sub> 1	-81,32	309,5	-0,263	0,799
pH 1	55,07	309,5	0,178	0,863
<hr/>				
$S^2 = 1238$				
<hr/>				
$r^2 = 64,9\%$				
<hr/>				
<b>Coef. Erro = valor nominal do erro calculado; T = valor T calculado; P = valor p calculado para a variável; S<sup>2</sup>= variância</b>				

Percebeu-se pelos resultados que a levedura de estudo não discriminou o tipo da fonte de carbono como determinante para a produção de suas proteínas (Tabela 7) quando isso acontece para a atividade enzimática (Tabela 6), pode se esperar que a levedura produza mais enzimas ativas.

Sendo assim, possivelmente a produção da lipase esteja ligada a concentração da fonte de carbono existente no meio, pois na presença do menor nível dessa variável no delineamento, menos proteína foi detectada em relação à média global e também menor atividade lipásica no sobrenadante foi observada.

Em relação à concentração protéica do meio, o modelo que melhor se ajustou aos dados estudados pôde ser descrito pelas variáveis significativas mostradas na Tabela 8. Denotando [C] = d; e a constante com seu valor nominal, obteve-se:

$$\text{Concentração proteica } (\mu\text{g/mL}) = 2204 - 604,8 d$$

Analisada a Figura 12, também se percebeu maior associação entre a produção de proteína e uréia, diferindo dos dados tanto de atividade lipásica e densidade ótica influenciadas para a fonte de nitrogênio já que, para aquelas variáveis, houve melhor associação para o nitrato de sódio.

Uma nova análise fora feita para as respostas advindas dos dados da atividade normalizada, ou seja, a razão atividade sobre dosagem protéica. Interessantemente, para as respostas das variáveis concentração da fonte de carbono e pH mostradas na

Figura 13 mostraram que quanto maiores eram os níveis das variáveis, maiores eram as respostas.

O efeito atividade normalizada estudada se trata de uma razão numérica na qual a dosagem protéica é o denominador. Sendo assim elevadas médias para atividade enzimática causadas pelo efeito de uma variável aliadas à baixas médias para dosagem proteica para essa mesma variável, acarretaria em altos efeitos para associar essa variável à atividade normalizada. Sendo assim a Figura 13 pode ser melhor compreendida.

A fonte nitrato de sódio (Figura 12, fonte B da tabela 3) apresentou efeito menos pronunciado para explicar a dosagem protéica em relação à fonte 3, uréia, naquele gráfico. Também nitrato de sódio foi a fonte mais significativa para explicar a atividade enzimática (Figura 9).

Logo para os dados da atividade normalizada, a fonte de nitrogênio nitrato de sódio foi a mais significativa ( $p=0,005$ , Tabela 9) para explicar o aumento da atividade normalizada dentre as demais no planejamento experimental (Figura 13).

Isso implica que sua utilização em um próximo delineamento, além de serem esperados valores totais de atividade lipásica mais elevados, espera-se que a lipase seja encontrada em um sistema menos heterogêneo, facilitando possivelmente subseqüentes purificações do catalisador.

Para a resposta de atividade específica, o modelo que melhor se ajustou aos dados estudados pôde ser melhor descrito pelas variáveis significativas mostradas na Tabela 9. Denotando [C] = e; Fonte de N1 (sulfato de amônio) = f; Fonte de N2 (nitrato de sódio)

= g e pH = h

e a

**Tabela 9 – Coeficientes de regressão para médias das atividades das enzimas lipases normalizadas pela dosagem protéica (U.L/ $\mu$ g)**

Termo	Coeficiente	Coef. erro	T	p
Constante	0,00904	0,00185	4,90	0,001
Fonte C 1	-0,00232	0,00181	-1,28	0,236
[C] 1	-0,00450	0,00181	-2,48	0,038
Uréia	-0,00620	0,00252	-2,47	0,039
NaNO <sub>3</sub>	0,01070	0,00279	3,84	0,005
[N] 1	-0,00198	0,00181	-1,09	0,306
Sal KPO <sub>4</sub> 1	-0,00170	0,00181	-0,94	0,375
pH 1	-0,00369	0,00181	-2,04	0,076

$$S^2 = 0,007251$$

$$r^2 = 78,3\%$$

**Coef. Erro = valor nominal do erro calculado; T = valor T calculado; p = valor p calculado para a variável; S= variância.**



constante com seu valor nominal, obteve-se:

$$\begin{aligned} \text{Atividade normalizada} \left( \frac{U}{\mu\text{g} \cdot 10^3} \right) \\ = 0,00904 - 0,00450e - 0,00620f + 0,01070g - 0,00369h \end{aligned}$$

Pela metodologia de fatoriais de níveis mistos, foi possível aqui eliminar uma das seis variáveis estudadas no primeiro planejamento fatorial. Também se rejeitou a hipótese da significância das variáveis uréia e nitrato de amônio como fontes de nitrogênio e também glicerol como fonte de carbono como as mais significativas para explicar a atividade enzimática, resposta escolhida para a otimização devido a capacidade de conversão de óleo em biodiesel ser determinado por essa resposta.

Na otimização da produção de lipase por *Pseudomonas aeruginosa* B-3556 utilizando da metodologia de Taguchi objetivou-se estimar variáveis e os ruídos com dois níveis que influenciavam os processos para aumentar a robustez do processo (Sabbaghian & Roostaazad, 2005).

Pelo estudo ocorreu redução dos 9 variáveis estudadas inicialmente para apenas 4 na segunda repetição da metodologia. Outra aplicação do planejamento fatorial de níveis mistos acarretou na diminuição de iniciais 8 ( $7^3+1^2$ ) variáveis para 4 ( $4^3$ ) variáveis que se mostraram significativos para a resposta pretendida. Essas variáveis foram submetidas a um delineamento composto central rotacional (Yu et al., 2007).

No caso da otimização da produção de lipase através da busca das variáveis que explicavam a atividade lipásica, observou-se que a melhor condição na qual a lipase pôde ser produzida foi aquela em que a [C] = 6%; fonte de carbono = óleo de oliva; pH = 8,0, fonte de nitrogênio =  $\text{NaNO}_3$ ; e  $[\text{KPO}_4] = 1\%$ . Como percebeu-se baixa influência da variável [N] na atividade lipásica excluiu-a para um próximo delineamento, mantendo as demais variáveis junto à nova etapa de otimização.

#### **4.5. Otimização do cultivo: Delineamento Fatorial completo ( $2^k + 1$ )**

##### **4.5.1. Otimização para Óleo de Oliva**

O delineamento de fatorial completo ( $2^k+1$ ), com quatro repetições no ponto central, mostrado no item 3.1.3 foi empregado para serem selecionadas as variáveis, seus níveis e também o efeito possível da combinação das variáveis em primeira, segunda ou até terceira ordem que interferiam a atividade enzimática de *M. spathulata* R25L270. As variáveis e níveis utilizados nessa seção foram estipulados a partir do item 4 – fatorial de níveis mistos.

Utilizou-se de um meio base para cultivo com concentrações fixas de nitrato de sódio a 0,1% e peptona 0,3% e concentrações variáveis de fonte de carbono (3 e 9%) (óleo de oliva ou glicerol); fosfato de potássio (0,1 e 1,5%), além do pH (6,5 e 8,0) (Tabela 10). Verificam-se na Tabela 10 também os resultados de atividade emulsificante e atividade lipásica.

**Tabela 10 – Delineamento fatorial completo ( $2^3+1$ ) com 4 repetições no ponto central para seleção das variáveis (codificadas e não codificadas) que influenciam nas respostas de atividade e atividade emulsificante de *Moniliella spathulata* R25L270 com glicerol e óleo de oliva como fontes de carbono.**

Ensaio	Codificadas			Não codificadas			Atividade (U.L <sup>-1</sup> ) óleo de oliva	Atividade emulsificante (%)	Atividade (U.L <sup>-1</sup> ) glicerol
	[C]	pH	PO <sub>4</sub>	[C]	pH	PO <sub>4</sub>			
1	-1	-1	-1	3	6,5	0,1	31,6282	84,00	0,6086
2	1	-1	-1	9	6,5	0,1	26,1317	86,67	0,1902
3	-1	1	-1	3	8	0,1	11,6585	93,33	0,7037
4	1	1	-1	9	8	0,1	26,8735	84,00	0,1711
5	-1	-1	1	3	6,5	1,5	9,5094	86,67	0,1902
6	1	-1	1	9	6,5	1,5	10,118	85,33	0,000
7	-1	1	1	3	8	1,5	0,6657	86,67	0,1522
8	1	1	1	9	8	1,5	-1,3503	52,00	0,3233
9	0	0	0	6	7,25	0,8	15,5954	86,67	0,1141
10	0	0	0	6	7,25	0,8	7,2461	88,00	0,2282
11	0	0	0	6	7,25	0,8	6,3332	94,67	0,1522
12	0	0	0	6	7,25	0,8	7,1701	86,67	0,1712

A análise de variância para os valores reais de atividade emulsificante, a 10 % de significância ( $p>0,1$ ) para o décimo primeiro dia de cultivo revelou que nenhum dos componentes do meio se apresentaram como variáveis significativas para a atividade surfactante (Tabela 11).

Sobre os dados de atividade emulsificante do Tabela 11, percebeu-se pouca variação nos resultados ( $r^2 = 47,8\%$ , Tabela 11), exceto para o frasco 8. A média, ou constante (Tabela 11), foi o único item que apresentou confiabilidade estatística

( $p < 0,1$ ). Indicando que independente dos níveis das variáveis, obteve-se um valor médio de emulsificante nos frascos de 82,3%.

Em relação às atividades enzimáticas para o dia em que foi encontrada a maior atividade, quinto dia, para o mesmo nível de significância de 10%, foi encontrado que as variáveis fontes  $PO_4$  e pH possuíam maior significância estatística para explicar a produção de lipase através dos seus respectivos p-valores, de 0,001 e 0,021 (Tabela 12). Nenhum efeito de segunda ordem pôde ser observado para essas variáveis.

Inicialmente o ajuste do modelo não apresentou significância estatística quando incluía a variável [C]. Assim, um novo modelo foi gerado excluindo essa variável e mantendo as demais, levando a um melhor ajuste desse novo modelo que, por sua vez, apresentou que 84,7% dos valores de atividade foram explicados pela alteração dos níveis das variáveis para o modelo linear.

**Tabela 11 – Coeficientes de regressão e tabela ANOVA para médias da porcentagem de emulsificante (%<sub>(v/v)</sub>) no décimo primeiro dia do planejamento fatorial completo com óleo de oliva.**

Fonte de variac	Grau Liber	Soma Quad	Soma Quad Ajust	Média Quad Ajust	Efeito	Coef	Erro padr Coef	F	T	p
Const	3	490,67	490,67	163,56		82,3	3,4	1,72	23,9	0,000
[C]	1	227,56	227,56	227,56	-10,7	-5,3	3,4	2,39	-1,6	0,166
pH	1	88,89	88,89	88,89	-6,7	-3,3	3,4	0,94	-1,0	0,366
$PO_4$	1	174,22	174,22	174,22	-9,3	-4,7	3,4	1,83	-1,4	0,218
Curv	1	118,52	118,52	118,52		6,7	6,0	1,25	1,1	0,301
Erro Res	7	665,33	665,33	95,05						
Erro Ajus	4	621,33	621,33	155,33					10,59	0,041
Erro puro	3	44	44	14,67						
Total	11	1274,52								

$S^2 = 9,7$

$r^2 = 47,8\%$

**Variac=variação; Trat=tratamento; Liber=liberdade; Soma Quad=soma quadrática; Ajust=ajustado; Padr=padrão; Curv=curvatura; Coef=Coeficiente; F=valor F; T=valor T; p=valor p.**

Percebeu-se que a concentração da fonte de carbono não foi determinante para explicar a atividade lipásica no cultivo utilizando óleo de oliva (Tabela 12),

contrariando as análises do primeiro delineamento fatorial de níveis mistos (item 4.2) em que essa variável era tida como significativa (Tabela 6). Notou-se também que embora o pH e o fosfato tenham aparecido como significativos para o fatorial completo (Tabela 12), eles não foram apontados como variáveis candidatas a otimização no experimento de fatorial de níveis mistos se fosse pretendido eliminar todas as variáveis não significativas indicadas ao invés de eliminar a variável menos significativa, como foi feito (Tabela 6).

O modelo matemático que melhor descreveu os dados de atividade desse delineamento pôde ser descrito a partir dos dados da Tabela 12 com a seguinte equação:

$$\text{Atividade (U.L}^{-1}\text{.s}^{-1}\text{)} = 73,23 - 6,59 i - 13,81 j$$

na qual denominou-se pH = i e a concentração do sal de fosfato = j.

**Tabela 12 – Coeficientes de regressão e tabela ANOVA para as médias das atividades (U.L<sup>-1</sup>) para o quinto dia de cultivo do planejamento fatorial completo com óleo de oliva.**

Trat	Grau Liber	Soma Quad	Soma Quad Ajust	Média Quad Ajust	Efeito	Coef	Erro padr Coef	F	T	p
Const	2	943,29	943,29	471,64		14,4	1,72	19,84	8,36	0,000
pH	1	195,43	195,43	195,43	-9,89	-4,94	1,72	8,22	-2,87	0,021
PO <sub>4</sub>	1	747,86	747,86	747,86	-19,3	-9,67	1,72	31,45	-5,61	0,001
Curv	1	75,42	75,42	75,42		-5,32	2,99	3,17	-1,78	0,113
Erro Res	8	190,22	190,22	23,778						
Erro Ajust	1	0,15	0,147	0,147				0,01		0,943
Erro puro	7	190,08	190,08	27,154						
Total	11	1208,93								

$$S^2 = 4,88$$

$$r^2 = 84,3\%$$

**Const= constante; Trat=tratamento; Liber=liberdade; Soma Quad=soma quadrática; Ajust=ajustado; Padr=padrão; Curv=curvatura; Coef=Coeficiente; F=valor F; T=valor T; p=valor p.**

Observou-se uma significativa influência das variáveis pH e fosfato para explicar o aumento da atividade enzimática visto o incremento que é proporcionado na atividade quando qualquer uma das duas variáveis é diminuída (Figura 14).

Sabe-se que tanto mais é confiável um planejamento fatorial, quando as condições para serem feitas as análises são melhor planejadas e executadas. Eliminou-se assim a realização de experimentos desnecessários por serem excluídas

combinações a serem testadas inutilmente, quando, por exemplo, as variáveis a serem experimentados não produzem efeito na variável resposta.

Dessa forma, selecionam-se e testam-se apenas aquelas variáveis que produzem resultados efetivos, economizando tempo, reagentes e outros capitais. Assim, tendo em vista as condições disponíveis na primeira situação de análise do experimento fatorial de níveis mistos, tomaram-se as decisões mais conservadoras naquela etapa tendo em vista não serem cometidos erros do tipo II ao eliminar o  $\text{PO}_4$  ou o pH por exemplo.

Preferiu-se arriscar em cometer o risco de erro de manter um fator com um efeito não significativo, levando-o para um próximo delineamento em cujo planejamento experimental seu efeito poderia ser melhor analisado. A eliminação errônea impediria que a eficácia do efeito da variável fosse atestada em um experimento seguinte. Assim, eliminou-se somente, a variável concentração da fonte de nitrogênio que não foi testada no planejamento fatorial completo.

### 8.3.2.Otimização para Glicerol

O delineamento de fatorial completo ( $2^k+1$ ), com quatro repetições no ponto central, mostrado no ítem 3.1.3 também foi selecionado para otimização de glicerol. Utilizou-se de um meio base para cultivo com concentrações fixas de nitrato de sódio a 0,1% e peptona 0,3% e concentrações variáveis de fonte de carbono (óleo de oliva ou glicerol); fosfato de potássio, além do pH (Tabela 10).

**Tabela 13 – Coeficientes de regressão e tabela ANOVA para as médias das atividades ( $\text{U.L}^{-1}$ ) para o quinto dia de cultivo do planejamento fatorial completo com glicerol.**

Trat	GL	SQ	SQA	MQA	Efeito	Coef	EPC	F	T	p
CsT	3	0,27219	0,27219	0,09073		0,29	0,0235	20,48	12,3	0
[C]	1	0,12226	0,12226	0,12226	-0,247	-0,124	0,0235	27,59	-5,25	0,003
pH	1	0,01809	0,01809	0,01809	0,0951	0,0475	0,0235	4,08	2,02	0,099
$\text{PO}_4$	1	0,13184	0,13184	0,13184	-0,257	-0,128	0,0235	29,76	-5,45	0,003
[C] *	1	0,10417	0,10417	0,10417	0,228	0,114	0,0235	23,51	4,85	0,005

PO <sub>4</sub>										
[C] *										
pH *	1	0,10417	0,10417	0,10417	0,124	0,0618	0,0235	6,9	2,63	0,047
PO <sub>4</sub>										
Curv	1	0,03057	0,03057	0,03057		-0,124	0,0408	9,2	-3,03	0,029
Erro Res	1	0,03057	0,03057	0,03057						
Erro Ajus	1	0,04075	0,04075	0,04075				3,4		0,169
Erro puro	5	0,02216	0,02216	0,00443						
Total	2	0,01537	0,01537	0,00767						

---


$$S^2 = 0,066$$

$$r^2 = 95,28\%$$


---

**CsT= constante; Trat=tratamento; GL=graus de liberdade; SQ=soma quadrática; SQA= soma quadrática ajustado; SQM= soma quadrática média; EPC=erro padrão do coeficiente; Curv=curvatura; F=valor F; T=valor T; p=valor p.**

Percebeu-se que as variáveis [C], pH e PO<sub>4</sub> foram significativas para explicar a variação da atividade lipásica (p-valores 0,003; 0,099 e 0,003, respectivamente). Também interações de segunda ordem com [C]\*PO<sub>4</sub> e terceira ordem [C]\*pH\*PO<sub>4</sub> foram significativas para explicar essa mesma variação (p-valores 0,005 e 0,047) (Tabela 13).

Inicialmente o ajuste do modelo não apresentou significância estatística quando foram consideradas as interações de [C]\*pH e pH\*PO<sub>4</sub>. Assim, um novo modelo foi gerado excluindo a contribuição dessas interações e mantendo as demais, levando a um melhor ajuste.

Esse novo modelo explicou 95,28% (Tabela 13) da variação da atividade através da alteração dos níveis das variáveis, além de ter apresentado o erro de ajustamento não significativo  $p > 0,1$ .

Analisado o modelo, descreveu-se a notação matemática mais adequada para a atividade enzimática pode ser expressa como:

$$(U.L^{-1}) = 0,290 - 0,124 k + 0,048 l - 0,128 m + 0,114 n + 0,062 o,$$

denotadas as variáveis [C] =k; pH = l; PO<sub>4</sub> = m; [C]\*PO<sub>4</sub> = n e [C]\*pH\*PO<sub>4</sub> = o

O valor médio da atividade enzimática foi menor em comparação com os cultivos utilizando óleo de oliva (Tabela 10), o que está em concordância com os dados observados no delineamento fatorial de níveis mistos do item 4.

Percebeu-se que o efeito de combinação da concentração de carbono e fosfato foi muito mais determinante no nível mais baixo dessa fonte enquanto no nível mais alto, o efeito da combinação sugeriu ser quase nulo (Figura 16).

A melhor condição para a produção de lipase por *M. spathulatha* foi encontrada em pH mais elevado e menor concentração de glicerol como fonte de carbono e menor concentração de fosfato (Figura 15). Os resultados experimentais médios para esse delineamento foram representados na Figura 17.

O resultado da melhora da atividade em função de um menor nível de fonte de carbono foi observado também para o experimento fatorial completo utilizando de óleo de oliva como fonte de carbono (Figura 14) contrapondo o indicado pelo fatorial de níveis mistos, pois, naquele delineamento, o modelo descrevia uma maior atividade enzimática em maiores concentrações da fonte de carbono (Figura 11).

Em otimização utilizando apenas fontes de carbono na produção de lipase de *Rhodotorula mucilaginosa* MTCC-8737, óleo de oliva apresentou os melhores resultados dentre as testadas (Chennupati, et al., 2009). Na otimização de *Geotrichum sp.* uma diferença de apenas 3,0U.mL<sup>-1</sup> foi encontrada entre a melhor fonte de carbono, óleo de soja, para a fonte óleo de oliva (Burkert et al, 2004). Possivelmente os resultados encontrados para *M. spathulatha* R25L270 poderiam ser replicados para outros óleos produzindo baixa mudança nos resultados. Também pode indicar a potencialidade dessa fonte na melhoria da produção de lipases por microrganismos.

Na otimização de cultivo de *Burkholderia multivorans*, percebeu-se que a fonte de carbono óleo de oliva foi significativo depois de uma triagem de variáveis iniciais para a concentração de 3% dessa variável. Para esse microrganismo, o fosfato foi a variável que exerceu o segundo maior efeito sobre a produção de lipases. (Gupta et al., 2007). Para otimização da produção da lipase de *Bacillus pumilus* RK31, óleo de oliva a 1% ao lado de tween 80 0,5% apresentaram os melhores resultados para explicar a variação na produção de lipase. A fonte fosfato teve o maior efeito dentre todas as variáveis para explicar a atividade lipásica em meio com óleo, mas não o pH, que foi excluído no delineamento preliminar de seleção (Kumar et al, 2011). Para *Candida sp.* notou-se que tanto óleo de soja quanto o fosfato apresentaram-se como fatores interferentes na produção de lipase (He, et al., 2006).

Por outro lado, de 12 fatores inicialmente triados para explicar a atividade lipásica, incluindo óleo de oliva, pH e fosfato, a fonte de carbono se mostrou significativa nessa associação em *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021 enquanto as demais (pH e fosfato) não se mostraram determinantes (Teng & Xu, 2008). Na otimização da produção da lipase de *Geobacillus thermoleovorans* CCR11, o óleo de açafraão bastardo e o pH não explicaram a produção de lipase para esse microrganismo e somente a temperatura e sopa nutriente de fontes de nitrogênio orgânicos exerceram a influência desejada (Sánchez-Otero et al., 2011). Em *Geobacillus* sp. ARM verificou-se a importância da fonte de carbono, extrato de levedura e peptona para explicar a produção da enzima, além de íons sódio e cálcio (Ebrahimpour, et al., 2008).

*Bacillus* sp. foi otimizado para produção de lipase frente a diferentes componentes cujo ótimo foi encontrado para glicerol 1%, fosfato 4%, dentre outros componentes, menos pH, que se mostrou não significativo (Gupta et al., 2004).

Nota-se que a regulação da produção de lipases é bastante singular para cada organismo, pela diferença de variáveis indutoras promovendo a produção em distintos microrganismos ainda que seja possível notar que algumas delas que tem maior ocorrência na produção de lipases como óleo de oliva (Burkert et al, 2004; Gupta et al., 2007; Chennupati, et al., 2009) e fosfato inorgânico (He, et al., 2006; Kumar et al, 2011).



## **8.4. Ensaios de padronização da purificação de lipase**

### **8.4.1. Padronização da purificação parcial por sulfato de amônio**

Nos ensaios de precipitação de enzimas lipásicas utilizando diferentes concentrações de sulfato de amônio (0 a 100 %) a partir do sobrenadante de cultivo de *Moniliella spathulata* com atividade detectável, percebeu-se que os extratos de 40 e 80% de saturação foram aqueles que produziam maior atividade lipásica quando reagem junto ao substrato sintético pNPP (Figura 18).

Entretanto, na repetição da metodologia não apareceu precipitado para a fração de 40% depois da centrifugação a 14000g sob as mesmas condições executadas anteriormente. Dessa forma, pretendeu-se assegurar o isolamento da primeira fração apresentando atividade, antes recolhida em 40% de saturação utilizando uma faixa de concentração de  $\text{NH}_4\text{SO}_4$  que conteria a enzima de interesse.

Sendo assim, recolheram-se dois extratos de saturação: um primeiro de 0-60% de saturação e um segundo com 80% de saturação e padronizou-se essa metodologia de precipitação como base para as demais purificações.

Os resultados encontrados sugeriram a produção de duas diferentes lipases por *M. spathulata* R25L270, já que existiram dois diferentes extratos apresentando atividade lipásica aumentada, enquanto ela para o mesmo ponto no sobrenadante era muito mais reduzida (Figura 18).

Diversos estudos tem relatado o isolamento de isoenzimas da lipase por meio de precipitação com sulfato de amônio. Entretanto, na utilização dessa estratégia nos trabalhos na literatura, ou não se conseguiu o isolamento dessas duas isoenzimas nessa etapa ou não se desejou isso no estudo em questão. Para *Geotrichum sp.*, atividade lipásica foi observada nas frações correspondentes a saturação de 30 – 60% (Cai et al., 2009). Na precipitação de lipases de *Pseudomonas monteilii* TKU009,

foram isoladas ambas as lipases conjuntamente para a condição de saturação de 30% (Wang et al., 2009). A precipitação empregou concentrações entre 60 – 75% de saturação no isolamento das lipases de *Thermosyntropha lipolytica* (Salameh & Wiegel, 2007). Utilizou-se um gradiente de 60 – 80% de saturação para precipitação das enzimas selvagens e recombinantes de *Rhizopus oligosporus var. microsporus*, resultando no isolamento das lipases em 60% (Iftikhar et al., 2011).

Este perfil de precipitação observado no ensaio pode ser resultante das diferenças das lipases produzidas por *M. spathulata*. Assim, elas podem ter se diferenciado na condição de saturação no isolamento das duas. A provável grande diferença superficial das enzimas de *M. spathulata* pode indicar uma distribuição de cargas em sua superfície, refletindo às suas solubilidades diferenciais. Sendo assim, cada proteína pode ter requerido uma concentração específica para remover sua camada de solvatação para ser precipitada. Possivelmente poderia haver diferenças na glicosilação entre essas enzimas ou distribuição de cargas na suas superfícies. Sabe-se que a solubilidade de uma proteína é em geral aumentada quando glicosilada (Lu et al., 2012; Solá & Griebenow, 2010).

#### **8.4.2. Ensaio de padronização das metodologias de separação pelo rastreamento de atividade das frações eluídas da enzima a partir de cultivo não otimizado**

##### **8.4.2.1. Estratégia inicial.**

Os extratos obtidos da precipitação com 60 ou 80 % de saturação de sulfato de amônio foram analisados por meio de cromatografia de gel filtração em coluna superose 12. Serão mostrados os cromatogramas de um sobrenadante de cultivo cuja atividade foi rastreada cujos resultados possibilitaram a montagem dos fluxogramas de purificação de lipase de *Moniliella spathulata* R25L270 (Figura 6 e Anexo 1).

##### **8.4.2.1.1. Cromatografia de exclusão molecular**

Utilizou-se da técnica de gel filtração inicialmente visto que ela tem sido amplamente utilizada para purificar lipases em 60% dos casos de separação de lipases (Saxena et al., 2003, Saisubramanian et al., 2008). Percebeu-se que ambos os perfis cromatográficos vindos de diferentes extratos de saturação (60 e 80%) do sobrenadante de cultivo de *Moniliella spathulata* em coluna Superose 12 apresentavam picos contendo atividade nas primeiras frações de eluição (Figura 19 e Figura 20). Porém nessa última figura, aparecia também um pico de atividade nas frações 10 e 11.

Os primeiros picos eluídos a partir dos extratos de 60 e 80% de saturação (Figura 19 e Figura 20) sugeriram que a proteína dessas frações possuíam alta massa molecular devido essa metodologia cromatográfica eluir proteínas de maior peso molecular primeiramente. A coluna Superose 12<sup>®</sup> opera sob uma faixa de peso molecular variando desde 1 kDa até aproximadamente 200 kDa em cromatográfica preparativa (SIGMA–ALDRICH). Porém proteínas glicosiladas possuem comportamento anômalo de eluição em coluna Superose 12<sup>®</sup>, pois podem não seguem um padrão de eluição proporcional ao seus pesos moleculares, ainda que o sistema cromatográfico esteja bem padronizado (Lee & Whitaker, 2004). Sendo assim, os resultados sugeriram uma faixa de tamanhos, mas não seriam eficientes para estimar pesos moleculares das proteínas eluídas.

Cogitou-se que a baixa resolução dos picos dos ombros 1-2 e 3-8 para ambas os extratos de saturação pode ter se explicado por existirem interações iônicas das proteínas eluídas com a matriz da coluna. Isso porque foi reportada melhor resolução cromatográfica para coluna Superose 12<sup>®</sup> quando a concentração de sais no tampão atingia níveis superiores a  $0,4\text{mol}^{-1}$  (Lee & Whitaker, 2004), provavelmente porque esses sais competiriam com as interações iônicas da proteína para com a coluna. Assim a concentração de sais no tampão não é considerada pelo fabricante como determinante para afetar a resolução cromatográfica (HEALTHCARE, 2006).

Foram percebidas diferenças nos perfis de eluição das frações de 60% e 80% após a cromatografia em Superose<sup>®</sup> 12, reforçando a hipótese de existirem duas lipases diferentes para *M. spathulata*. Os tempos de eluição dos picos com maior atividade na cromatografia do extrato de 60% surgiram nas frações eluídas 3–9 (Figura 19). Na cromatografia do extrato de 80% essas surgiram picos de atividade nas frações 2–8 e 10-11 (Figura 20).

Analisando a similaridade entre as metodologias dos diferentes extratos inicialmente pelo perfil das proteínas eluídas, notou-se que para ambos os processos de separação, a fração com maior quantidade de proteínas foi a de

número 10-11 (Figuras 19 e 20). Existiu também um pico inicial consensual eluído na fração 2 e 3 nas duas condições. Percebeu-se também que as frações de número 2 e 3 apresentaram atividade para ambos os extratos (Figuras 19 e 20).

As diferenças nos perfis de eluição foram os seguintes. Um pico entre as frações 3-9 não apareceu tão pronunciado na cromatografia do extrato de 80% (Figura 20) quanto no de 60% (Figura 19). Percebeu-se que uma grande atividade

relativa foi detectada no ombro recolhido entre as frações 3–9 na eluição da fração de 60% (Figura 19) que não aparece tão pronunciado na cromatografia da fração de 80% (Figura 20) por sua vez. Além disso o pico da fração 11 com maior quantidade de proteínas eluídas para a fração de 60% (Figura 19) não apresentou atividade frente ao substrato sintético, assim como foi observado na cromatografia da fração de 80% (Figura 20), cujo frasco de mesmo número apresentou a maior atividade enzimática .

Todas as diferenças entre as cromatografias dos extratos de 60% e 80% eluídos através dos dois perfis cromatográficos apontaram novamente para a existência de mais de uma lipase produzida por *Moniliella spathulata* R25L270. Uma primeira forma com alto peso molecular recolhidas nas frações consensuais 2 e 3 das cromatografias dos extratos de 60% (Figura 19) e 80% (Figura 20) de saturação de sulfato de amônio. A segunda forma exclusiva das frações ativas de número 3–9 da cromatografia com o extrato de 60% de saturação (Figura 22). Uma terceira possível lipase presente nas frações de número 10-11 da cromatografia do extrato de 80% de saturação de sulfato de amônio (Figura 20).

Cabe ressaltar que as frações número 2 e 3 dos dois processos cromatográficos poderiam ainda ser duas lipases distintas visto que elas vieram de duas frações de saturação diferentes (Figuras 19 e 20). Além disso, as frações eluídas a partir do extrato de 80% de saturação constituíram o ombro de números 3 a 7 (Figura 20) apresentou dois picos de atividade com um pequeno vale de atividade entre eles, tudo isso em uma região em que as proteínas não estão bem resolvidas entre si. Isso pode ser um indicativo de existir duas lipases para aquela região também.

Em geral as lipases de microrganismos que possuem duas isoformas dessa enzima possuem valores distintos de peso molecular, o que resulta em perfil cromatográfico diferente empregando a técnica de gel filtração. Para as lipases de *Geotrichum* sp SYBC WU–3, houve diferença de 5,3 kDa entre as lipases A (41,1 kDa) e B (35,8 kDa) (Cai et al., 2009). As lipases A e B de *Thermosyntropha lipolytica* diferiam em apenas 7 kDa entre si 50 kDa (lipA) e 57 kDa (lipB) (Salameh & Wiegel, 2007). Similarmente, as lipases A e B de *Candida cylindracea* diferiram em suas massas em apenas 2 kDa, 64 kDa (lipA) e 62 kDa (lipB) (Rúa et al., 1992). As quatro lipases de *Geotrichum candidum* ATCC 34614 (I e II) e CMICC 335426 (a e b) estavam glicosiladas. Suas massas eram de 62, 62, 62 e 58,3 kDa, respectivamente. A glicosilação de suas moléculas conferia um aumento médio de 7,86% na sua estimativa de massa (Sidebottom et al., 1991). Por outro lado, a purificação das lipases de *Pseudomonas monteilii* TKU009, proporcionou o recolhimento de uma

fração insolúvel (lipA), incapaz de ter seu peso estimado, e outra solúvel com 40 kDa (lipB) (Wang et al., 2009).

A partir dos dados da literatura percebeu-se que, em geral, as lipases diferem de peso molecular entre si muito pouco quando são produzidas pelo mesmo microrganismo. O fato de terem sido isoladas frações com atividade lipásica em picos eluídos em tempos bastantes distintos é um indício de que podem existir lipases com diferenças significativas de peso molecular (Figuras 19 e 20). Sobretudo quando se analisam os picos de maior atividade entre as cromatografias dos extratos de 60 e 80%.

#### **8.4.2.1.2.Cromatografia de fase reversa**

A cromatografia de fase reversa foi feita com as frações ativas concentradas do frações da filtração molecular. Primeiramente tomou-se as frações 2 e 3 concentradas e aplicou-as no sistema de separação (Figura 21). Muito embora várias frações tivessem sido retidas na coluna, elas não apresentavam atividade lipásica. Afinal, mesmo utilizando a solução das frações diretamente na reação de atividade sem diluí-las, foram necessárias três horas de reação com o substrato sintético pNPP para uma leitura em espectrofotômetro ser possível. Ainda assim, não existiu satisfatória correlação entre os dados obtidos na cinética nas frações com o perfil cromatográfico, indicando que para a leitura feita nas frações poderia ter ocorrido a degradação (hidrólise) do reagente e não a reação catalisada por enzima.

Na cromatografia das frações 10 e 11 (Figura 22), ainda que na fração eluída percebeu-se uma atividade muitíssimo diminuída, ela se correlacionou bem com o perfil de proteínas nessas frações. Além disso, embora o pico de atividade não estivesse relacionado com a fração que estava interagindo com a coluna (frações 4–11), a técnica conseguia isolar a fração da proteína com atividade das outras frações demais presentes no concentrado (frações 18–29) obtido na cromatografia de gel filtração.

Analisando novamente o cromatograma da Figura 22, cujas frações produzidas na técnica apresentaram atividade somente nas alíquotas iniciais que foram eluídas apenas com a fase A, cogitou-se a possibilidade de moléculas orgânicas presentes no eluente estarem interferindo na atividade da enzima. Possivelmente a acetonitrila (ACN) pudesse apresentar um efeito mais danoso para a atividade da enzima em relação ao ácido trifluoroacético (TFA), refletindo na sua inativação quando a ACN estivesse presente no eluente. Para o pool das frações 2 e 3 eluídos, os efeitos de

TFA e ACN foram igualmente e criticamente importantes para inibir a atividade da enzima.

Além disso, é possível que a razão da lipase não ter sido ligada à coluna de fase reversa para a fração 10 e 11 poderia ser devido que ela estivesse muito glicosilada, pois em geral a glicosilação interfere aumentando o grau de hidrofiliidade das proteínas, também aumentando sua carga líquida negativa e o raio hidrodinâmico das mesmas (Varki et al., 2009). Lipases de *Thermomyces lanuginosus* diferencialmente glicosiladas não tiveram sua capacidade de interagir com superfícies hidrofóbicas mudada, em contrapartida, foi distinta a interação com superfícies hidrofílicas dependendo do tipo de glicosilação (Pinholt et al., 2010). A lipase do mesmo microrganismo quando não glicosilada se associava com maior afinidade a superfície apolar C18 em comparação com uma superfície hidrofílica (Sonesson et al., 2008).

Como o processo cromatográfico por fase reversa envolve a interação simultânea de fases polares e apolares, o comportamento interativo da lipase será dado pela energia livre de interação global: a soma da energia livre das interações hidrofílicas e hidrofóbicas envolvidas (Queiroz et al., 2001). Se as lipases tem suas interações com superfícies hidrofílicas favorecidas essas enzimas poderiam responder similarmente em meios líquidos devido à natureza das interações nesse novo meio poder ser a mesma. Ou seja, quando a proteína estivesse no sistema cromatográfico de fase reversa, ela interagiria fracamente com a fase fixa, adsorvendo-se preferencialmente com a fase móvel demonstrou glicosilação, sendo eluída mais rapidamente.

Algumas lipases tem se comportado de maneira bem distinta em sistemas de fase reversa. Em geral elas se ligam às colunas e são eluídas com valores diferentes de gradiente. A lipase de *R. oryzae* foi eluída em 12% de acetonitrila. A enzima análoga de *Mucor hiemalis f. hiemalis* foi eluída em 9% de acetonitrila, mas para a enzima *Penicillium cyclopium* o gradiente teve de atingir 55% (Hiol et al., 2000).





Decidiu-se por fazer a espectrometria de massas dos picos com atividade recolhidos na fração 4 a 6 da cromatografia de fase reversa da Figura 22, porém somente a fração 6 produziu íons detectáveis. A maior razão massa/carga possuía baixa intensidade. Mesmo assim, seu valor revelava uma massa muito inferior (16.357,5Da) à uma faixa média esperada para uma lipase de 30 a 60 kDa (Figura 23).

Esse resultado novamente foi mais um indício de que as frações testadas possuem conteúdo elevado de glicosilação. Isso porque a matriz mais adequada para ionizar proteínas glicosiladas é aquela contendo o ácido 2,5 dihidroxibenzoico (DHB) (Mank et al., 2004, Hedrich et al., 1993).

#### **8.4.2.1.3. Cromatografia de troca iônica**

A cromatografia de troca iônica foi usada para a separação da lipase de *M. spathulata* R25L270 visto que a maioria dos trabalhos utiliza tanto técnicas de troca aniônica quanto catiônica para isolamento da enzima microbiana (Saxena, et al, 2003). Algumas frações eluídas da gel filtração que poderiam apresentar carga em sua superfície e serem separadas devido a essa característica. As cromatografias seguintes possibilitariam tanto para prever a carga líquida das enzimas quando para promover a separação das mesmas.

##### **8.4.2.1.3.1. Cromatografia de troca aniônica**

Foi recolhido extrato de 80% de saturação de sulfato de amônio e depois concentradas as frações ativas remanescentes na cromatografia de filtração molecular para as amostras serem cromatografadas em troca aniônica. Primeiramente as frações ativas 2, 3 e 4 da gel filtração (Figura 19) foram agrupadas para produzir um extrato que foi injetado na coluna de troca aniônica. Percebe-se pelo perfil de eluição dessas frações uma má interação delas para com a fase fixa coluna (Figura 24), já que toda a fração ativa foi eluída, sugerindo fraca carga líquida positiva nela para interação com a fase fixa em pH 8,0.

Contudo as frações entre 32 e 40 (Figura 24) apresentaram proteínas com satisfatória interação com a coluna e, para a eluição delas, foi necessário um gradiente de 58 a 80% de fase B. Porém essas frações eluídas apresentaram baixa resolução, formando um ombro que não apresentou nenhuma atividade lipásica satisfatória, tanto para a cromatografia do pool de frações 2, 3 e 4 quanto para as frações 10 e 11 (Figura 25).

Os resultados sugeriram que outras proteínas estariam possivelmente agregadas às lipases, pois as cromatografias de troca iônica até então possuem certa

similaridade, apresentando um pico inicial com praticamente toda a proteína injetada no sistema, mesmo quando as frações de origem eram distintas (Figuras 27 e 28). Provavelmente devido à agregação das proteínas, as cargas disponíveis para a interação com a coluna tenham sido poucas, pois as suas partes polares negativas glicosiladas poderiam estar interagindo intensamente entre si e exporiam mais suas porções apolares, embora a proteína estivesse solúvel. Assim as enzimas agregadas estariam pouco interativas com a fase fixa da coluna devido a possível carência de grupos carregados expostos. Essa hipótese estaria apoiada no fato de que a resolução das cromatografias de fase reversa (Figuras 24 e 25) foram bem mais elevadas do que na cromatografia de troca iônica.

Cogitou-se, também, que as proteínas eluídas no sistema de troca iônica poderiam também estar agregadas através da sua forte interação de suas partes polares e glicosiladas. Como a proteína estava solúvel, os grupos expostos da lipase e das outras possíveis proteínas agregadas poderiam apresentar uma carga líquida positiva também, inibindo a interação com a coluna.



Analisando a purificação no sistema de troca aniônica sob a ótica inversa, ou seja, a ligação de proteínas indesejadas no sistema de purificação e a eluição das proteínas desejadas, existiria da mesma forma a purificação. Porém percebeu-se pelos cromatogramas que a quantidade de proteína retida na coluna variou significativamente para as os dois pools de atividade eluídos 2, 3 e 4 ou 10 e 11 (Figuras 27 e 28). A resolução da técnica se mostrou baixa visto que quase nenhuma ou poucas frações protéicas interagiram com a coluna, gerando um pico que pode conter muitas impurezas. Sendo assim, uma nova metodologia de purificação para ser testada se fazia necessária e executou-se a troca catiônica.

#### **8.4.2.1.3.2. Cromatografia de troca catiônica**

Foi feito um teste com o pool de frações ativas (3 a 7) advindo da cromatografia de gel filtração do extrato de 60% de saturação (Figura 19). Percebeu-se um perfil de eluição distinto das cromatografias em troca aniônica, sobretudo porque foram isoladas duas frações distintas com atividade enzimática por essa técnica (Figura 26).

Se observou um pico inicial eluído apenas com a fase A, seguido da eluição de um pico com atividade enzimática no início do gradiente (Figura 26). A partir desses dados, pode-se supor que exista um agregado inicial proteico contendo uma lipase ativa que não exibe carga líquida suficiente para interagir com a coluna (frações 1-3) e uma segunda fração com lipase contendo carga positiva que interage com a coluna (frações 13-19). Essas frações poderiam também estar agregadas com outras proteínas, culminando com uma fraca interação delas com a coluna, visto que a resolução do pico de atividade ficou comprometida (Figura 26).

A ligação parcial da enzima com atividade na coluna em um sistema cromatográfico de troca catiônica reforça as suposições sobre a natureza superficial positiva da enzima. Mas também reforça a suposição de que a enzima possuía um número reduzido de cargas em sua superfície, pois foi necessário um gradiente sutil (5 – 20%) da fase B para provocar sua desorção da coluna cromatográfica.

#### **8.4.3. Purificação da lipase pela estratégia 2 e identificação da influência das fontes de carbono no meio de cultivo sobre padrão de produção de lipases por *M. spathulata* R25L270.**

Os resultados mostrados foram os gerados a partir da purificação da lipase utilizando os passos anteriormente testados que produziram os melhores resultados: cromatografia de gel filtração seguida de cromatografia de troca iônica, mas



também a etapa adicional de afinidade deveria ainda ser testada.

Também foi feita essa purificação a partir de dois sobrenadantes de cultivo distintos. Um utilizando de fonte de carbono óleo de oliva e outro empregando glicerol (item 2.3). Nessa estratégia a etapa de precipitação por sulfato de amônio gerou resultados similares aos já reportados e os dados não foram mostrados.

#### **8.4.3.1. Cromatografias de gel filtração e identificação da influência das fontes de carbono no meio de cultivo sobre padrão de produção de lipases por *M. spathulata* R25L270.**

Na repetição da metodologia de gel filtração, quando se recolheu e purificou os sobrenadantes de cultivo da cultura de *M. spathulata* R25L270 crescido em meio contendo ou glicerol ou óleo de oliva, observou-se distinção no comportamento das frações eluídas para cada fração de saturação. Notou-se que o perfil de eluição das proteínas seguia a mesma tendência geral para todas as cromatografias como foi observado nas Figuras 19 e 20, independentemente da fonte de carbono ou extrato com fração de saturação (Figuras 27, 28, 29 e 30).

O primeiro cultivo fora feito utilizando-se de óleo de oliva como fonte de carbono (Figuras 19 e 20). Comparando as duas cromatografias feitas sob a mesma condição – extrato de 60% de saturação de sulfato de amônio de um cultivo de óleo de oliva - (Figuras 19 e 28), se percebeu uma satisfatória reprodutibilidade da técnica em termos qualitativos, pois os picos de atividade foram eluídos nas frações iniciais juntos a um ombro inicial nas duas técnicas.

Comparando a cromatografia da fração de 80% da primeira padronização com a segunda tentativa notou-se também similaridade na repetição da técnica (Figuras 20 e 30). Entretanto o pico que apresentou maior atividade na primeira cromatografia foi aquele com frações recolhidas próximas as de número 10 e 11 (Figura 20). Nessa nova tentativa, percebeu-se que o pico recolhido no pool de frações de números 3 a 7 foi mais ativo do que as frações recolhidas nos picos 10 e 11 (Figura 20).

Porém foi percebido que na cromatografia da repetição do método da fração de saturação de 60% (Figura 28), ocorreu uma diminuição da resolução da coluna devido o contorno dos picos das frações recolhidas, sobretudo para a região das frações ativas 2-4 não apresentarem picos bem definidos. A cromatografia do extrato de 80% do meio de cultura contendo óleo de oliva como fonte de carbono (Figura 30) também apresentou menor resolução comparando com a primeira tentativa (Figura 20). As principais mudanças foram o desaparecimento do pico na fração 2 da segunda

tentativa, o aumento da intensidade do ombro de números 3 a 7 e o desaparecimento dos picos da fração 11 (Figura 30). Isso sugeriu que a proteína poderia estar efetivamente se ligando de forma irreversível à coluna devido à carência de sal no tampão de eluição, bloqueando os sítios de interação na fase fixa e prejudicando assim sua capacidade de resolução.

Também puderam ser observadas interessantes diferenças do perfil de produção de uma mesma fração de saturação quando ela adviesse ou de glicerol ou de óleo de oliva. Notou-se um aparente aumento relativo de produção da lipase recolhida nas frações 10 e 11 para as frações advindas do cultivo com glicerol em comparação com óleo de oliva em ambos os extratos de saturação (Figura 27 e Figura 29). Notou-se que os cultivos em fonte de carbono óleo de oliva, para os dois extratos de saturação, possibilitaram o recolhimento das frações mais ativas junto a um ombro das frações 2 a 7 (Figura 28 e Figura 30).

Essa tendência em particular pode refletir o efeito que a fonte de carbono exerce na produção da lipase. Supos-se existir diferentes promotores de lipase induzidos por óleo de oliva ou glicerol no microrganismo de forma que, quando essas fontes de carbono estivessem presentes ou ausentes, seria variada a intensidade dos transcritos que originariam as lipases, repercutindo no diferencial perfil cromatográfico das amostras purificadas.

#### **8.4.3.2. Cromatografias de troca aniônica**

Segundo o fluxograma de trabalho (Anexo 1), submeteram-se as amostras purificadas em gel filtração para uma nova técnica já previamente testada na tentativa de isolamento das possíveis diferentes lipases produzidas. As frações purificadas na cromatografia de gel filtração, foram separadas nas suas frações 2 e 3, constituindo o primeiro pool de atividade; as frações 4, 5 e 6, constituindo o segundo pool de atividade e o terceiro foi constituído pelas frações agrupadas 10 e 11. Como haviam 2 frações ativas obtidas na precipitação que poderiam vir de cultivo com duas fontes de carbono distintas, foram feitas  $2 \times 2 \times 3 = 12$  corridas em troca iônica.

Foi possível recolher frações ativas derivadas da técnica de gel filtração como aquelas obtidas em 60% de saturação de sulfato de amônio e um segundo grupo obtido em 80%. Observou-se inicialmente que todos os pools obtidos através da precipitação em 80% de saturação perderam praticamente







toda sua atividade enzimática (Figura 31). Isso indicou novamente a existência de duas diferentes lipases produzidas por esse microrganismo.

Em contrapartida, as frações concentradas a partir do extrato de 60% de saturação que ainda possuíam atividade foram aplicadas na coluna de troca iônica e geraram outras frações que não responderam bem à estratégia de purificação. Nenhum pico foi retido na coluna para todos os pools testados para essa fração de saturação (Figura 32).

Analisando quantitativamente os resultados produzidos por essa estratégia experimental (Tabela 14), observou-se que inicialmente o meio contendo glicerol, embora tenha uma atividade por volume de sobrenadante menor do que a do óleo de oliva possui maior atividade específica do que o sobrenadante de cultivo contendo o óleo. Isso particularmente é bastante interessante visto que utilizando de resíduo contendo glicerol como fonte de carbono para produzir lipase ao invés de óleo de oliva essa produção poderá requerer menores etapas de purificação para a obtenção da enzima.

Esse fato reforça o uso de *Moniliella spathulata* R25L270 como organismo fonte de lipase visto que ele possivelmente poderia não somente utilizar um resíduo industrial para produzir o catalisador lipolítico que retornaria no processo, reduzindo o custo final de operação, mas também poderia produzir o bioproduto mais puro do que utilizando a fonte de carbono mais cara, nesse caso o óleo, barateando o processo mais uma vez.

Notou-se também que de modo geral o rendimento médio das purificações foi extremamente baixo ( $\bar{x}= 13,4\%$ ) (Tabela 14). A cromatografia de troca iônica não apresentou um perfil de eluição interessante, através da falta de ligação de algumas proteínas junto à coluna, liberando um pool de lipases ativa em basicamente uma fração, refletindo em um baixo fator médio de purificação ( $\bar{x}=5,67$ ) (Tabela 14).

#### **8.4.3.3.Cromatografias de afinidade**

Percebeu-se que a atividade total das frações que continham lipases da técnica de troca iônica que também vieram de um sobrenadante de cultivo utilizando de óleo de oliva como fonte de carbono já era bastante baixa depois de etapa de purificação ( $\bar{x}= 2,92 \text{ U.L}^{-1}$ ). Portanto, como a atividade total seguia uma tendência geral de queda, sem apresentar etapas com rendimento de purificação significativos, decidiu-se não testar essas amostras com atividade baixa em uma nova etapa de



**Tabela 14 – Tabela de Rendimento de purificação do planejamento de purificação do fluxograma do Anexo 1**

	<b>G</b>						<b>O</b>					
Atividade (U.L <sup>-1</sup> )	37,834						250,620					
Dosagem (mg/mL)	258						314					
Atividade normalizada (U.g <sup>-1</sup> )	0,1						0,8					
	<b>GN6</b>			<b>GN8</b>			<b>ON6</b>			<b>ON8</b>		
Atividade (U.L <sup>-1</sup> )	64,792			78,496			68,906			97,449		
Dosagem (mg/mL)	61			276			183			214		
Atividade normalizada (U.g <sup>-1</sup> )	1,1			0,3			0,4			0,5		
Fator de purificação	11			3			0,5			0,6		
Rendimento atv. (%)	171,3			207,5			27,5			38,9		
	<b>GN6F1</b>	<b>GN6F2</b>	<b>GN6F3</b>	<b>GN8F1</b>	<b>GN8F2</b>	<b>GN8F3</b>	<b>ON6F1</b>	<b>ON6F2</b>	<b>ON6F3</b>	<b>ON8F1</b>	<b>ON8F2</b>	<b>ON8F3</b>
Atividade (U.L <sup>-1</sup> )	16,942	22,759	5,306	33,036	24,477	2,415	2,396	4,660	1,560	2,625	4,564	1,731
Dosagem (mg/mL)	9,7	23,0	37,7	8,0	17,0	42,3	6,0	13,4	44,2	4,6	10,4	40,6
Atividade normalizada (U.g <sup>-1</sup> )	0,024	0,031	0,013	0,089	0,019	0,005	0,027	0,013	0,004	0,035	0,017	0,004
Fator de purificação	0,02	0,03	0,01	0,31	0,07	0,02	0,07	0,03	0,01	0,08	0,04	0,01
Rendimento atv. (%)	26,149	35,126	8,190	42,087	31,182	3,077	3,478	6,762	2,263	2,693	4,684	1,776
	<b>GN6F1</b>	<b>GN6F2</b>	<b>GN6F3</b>	<b>GN8F1</b>	<b>GN8F2</b>	<b>GN8F3</b>	<b>ON6F1</b>	<b>ON6F2</b>	<b>ON6F3</b>	<b>ON8F1</b>	<b>ON8F2</b>	<b>ON8F3</b>
	<b>T1*</b>	<b>T1*</b>	<b>T1*</b>	<b>T1*</b>	<b>T1*</b>	<b>T1*</b>	<b>T1*</b>	<b>T1*</b>	<b>T1*</b>	<b>T1*</b>	<b>T1*</b>	<b>T1*</b>
Atividade (U.L <sup>-1</sup> )	2,339	7,075	4,812	7,113	3,195	1,967	1,633	1,700	1,567	1,600	1,767	1,603
Dosagem (mg/mL)	2,7	9,1	15,8	3,9	14,6	37,4	2,9	7,1	37,4	0,8	4,6	31,1
Atividade normalizada (U.g <sup>-1</sup> )	0,635	0,251	0,034	0,843	0,168	0,006	0,082	0,065	0,004	0,350	0,100	0,006
Fator de purificação	26,37	10,40	1,39	9,44	1,88	0,07	3,00	2,39	0,15	10,02	2,85	0,16
Rendimento atv. (%)	13,81	31,09	90,68	21,53	13,05	81,42	68,16	36,48	100,46	60,96	38,71	92,65

**Legenda: N = precipitação por sulfato de amônio; 6= fração de 60% de saturação; 8= fração de 80% de saturação; F = cromatografia de gel filtração; 1 = 1º pool de atividades (frações 2 e 3); 2 = 2º pool de atividades (frações 4 a 7); 3 = 3º pool de atividades (frações 10 e 11); T = Cromatografia de Troca Iônica; 1\* = único pool de atividades da troca iônica.**

purificação. Em contrapartida, tomaram-se apenas três amostras para testar a cromatografia de afinidade (GN6F1T1; GN6F2T1 e GN6F3T1) para verificar o comportamento dessas amostras frente uma nova técnica de purificação (Anexo 1).

Foram recolhidas e concentradas as frações dos pools com atividade que passaram pela técnica da troca iônica individualmente que foram isolados a partir do extrato do sobrenadante de cultivo com glicerol com 60% de saturação, pois depois da cromatografia de troca iônica elas apresentavam atividades totais possíveis de serem detectadas em três pools distintos. Resolveu-se aplicar os pools em coluna de afinidade por heparina devido à técnica ter se mostrado útil na separação de algumas lipases e outras enzimas correlacionadas (Farooqui et al., 1998). Entretanto aqui, as amostras não possuiriam nome específico.

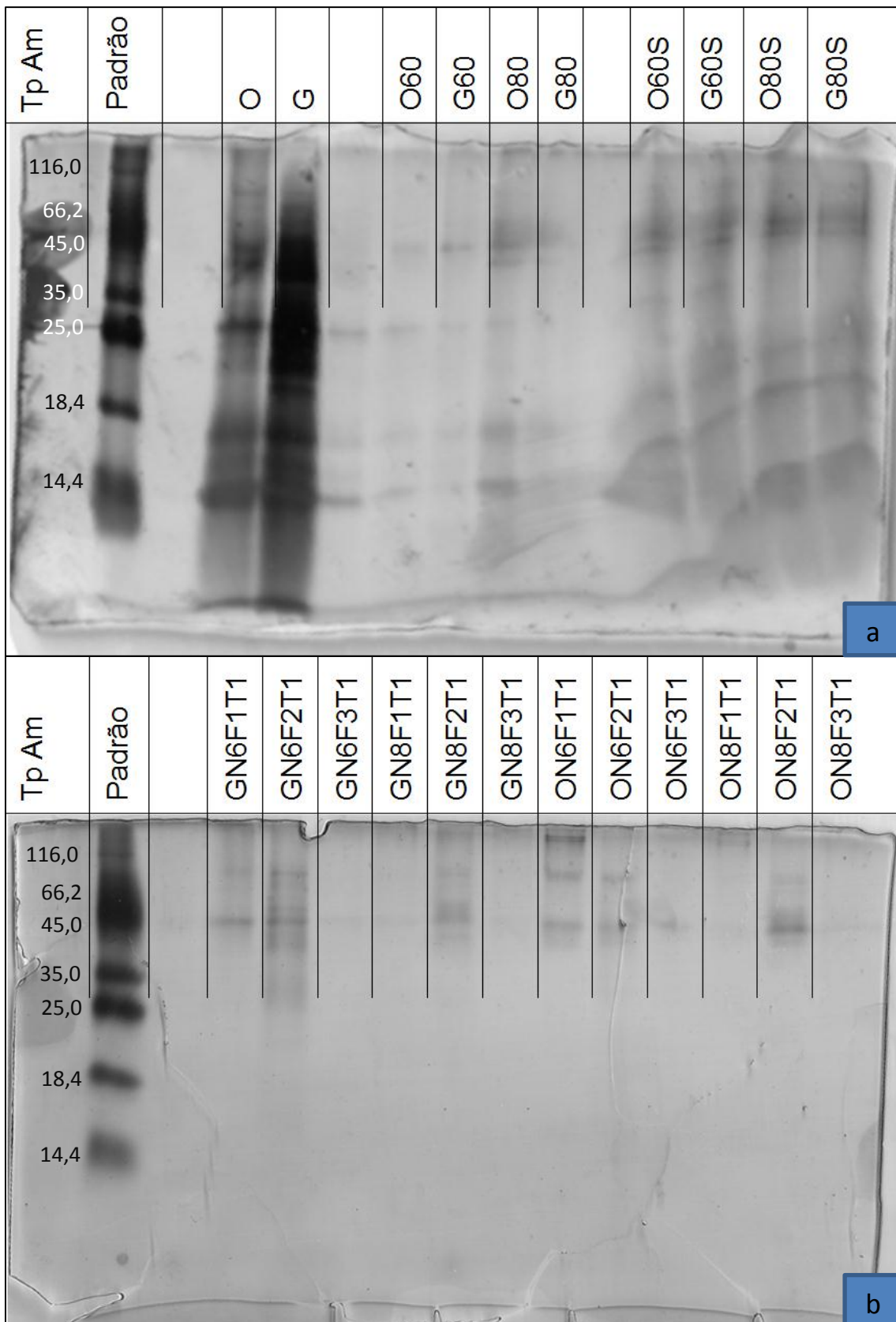
A heparina é um glicosaminoglicano e um polímero altamente sulfatado, possuindo uma carga líquida negativa extremamente grande o que confere a essa substância capacidade de interagir fortemente com várias outras macromoléculas. O mecanismo de interação proposto para sua interação pode ser de duas formas: ligação com cargas positivas em modo cooperativo ou ligação específica, por exemplo, com antitrombina III (Farooqui et al., 1998).

As primeiras amostras testadas (GN6F1T1; GN6F2T1), se ligaram parcialmente na coluna (Figura 33). Como o mecanismo de interação da heparina não é somente específico de afinidade, forças de natureza iônica das partículas podem também ter desempenhado papel interessante no estabelecimento das interações da proteína para com a fase fixa. A lipase poderia estar glicosilada a apresentando grande carga líquida negativa, exibindo agrupamentos não interativos com uma superfície também negativa ou específica da heparina, o que explicaria a atividade ter sido detectada pelas proteínas eluídas nos primeiros picos (Figuras 33 e 34). Inversamente, as proteínas interativas com a fase fixa contidas nos picos recolhidos em gel filtração nas frações de 2 a 7 podem ter carga líquida positiva (Figura 34). Na Figura 38a foram percebidas grandes quantidades de proteínas nas amostras G e O e nos pellets O60, G60, O80 e G80, e que não existem proteínas de peso molecular na Figura 38b, depois de feita a gel filtração e troca iônica nas amostras contendo atividade. Esses dados corroboram a hipótese de agregação da lipase, juntos da Figura 35.

A média de peso molecular encontrada na Figura 35b é bem mais alta do que se encontra para uma lipase (Sharma et al., 2001) sugerindo a agregação da lipase. Também o arraste da fração GN6F2T1\* na mesma Figura pode sugerir que uma da







**Figura 35 - Eletroforese das frações com atividade lipásica.** (a) frações de sobrenadante de cultivo e da precipitação por sulfato de amônio sendo os sobrenadantes com sufixo S e pellets sem sufixo. (b) frações recolhidas depois da cromatografia de troca iônica. Gel desnaturante 12,5% contendo SDS e corrido a 120V. Coloração por prata.



bandas que representam o agregado pode ter se decomposto em frações menores durante o processo da eletroforese, exibindo o padrão de arraste.

#### **8.4.3.4. Cromatografia de fase reversa: Estudo do efeito de diferentes solventes orgânicos na atividade lipásica para escolha da fase móvel da cromatografia de fase reversa**

Devido à técnica de cromatografia de afinidade não ter sido bem sucedida para purificar a lipase, já que ela não isolou frações bem resolvidas decidiu-se por retirá-la da série experimental e tentar utilizar de outras metodologias para o isolamento da biomolécula.

Sendo assim, resolveu-se investigar outros solventes para purificar a fração obtida na cromatografia de gel filtração pela cromatografia de fase reversa para que não existisse inativação da enzima. Nesse estudo observou-se o extremo efeito deletério exercido na atividade lipásica pela acetonitrila explicando os resultados das cromatografias iniciais utilizando esse solvente no tampão B (Figura 21 e 22).

Ainda assim, quando se utilizou o metanol (Figura 36, em vermelho) para uma nova tentativa de purificação nas mesmas condições anteriores, os resultados não foram satisfatórios também (dados não mostrados). A escolha do metanol foi devida a impossibilidade do emprego do DMSO devido à sua elevada viscosidade.

Esses resultados já apontam as lipases de *M. spathulatha*, como sensíveis a solventes orgânicos. Como a adição dos solventes testados na Figura 36 junto à lipase foi feita em uma única etapa e a concentração final foi bastante elevada, provavelmente a enzima pode ainda ser parcialmente resistente a solventes orgânicos, porém não em condições em que foram testadas. Devido à adição de solvente orgânico em uma única etapa já ter sido reportada como nociva para a lipase em termos de atividade, se faz a adição do solvente no meio catalítico em etapas em reatores (Tan et al., 2010; Nie et al., 2006). Embora esse tenha sido um estudo de estabilidade preliminar com o intuito de melhorar a purificação da enzima, percebeu-se pelos resultados alcançados que é merecida uma abordagem sobre os efeitos inibitórios dos solventes orgânicos sobre a enzima, tanto para ajudar caracterização da enzima, mas também para a purificação da mesma.

O estudo da estabilidade sobre a enzima pura de *Rhizopus oryzae* revelou que o metanol foi aquele solvente (30%, 1h) dentre 13 que proporcionou os valores de atividade mais baixos (Hiol, et al., 2000). Para lipase de *Cryptococcus sp.* o benzeno sobrepôs o efeito inibitório do metanol sobre esse catalizador, depletando a atividade

da enzima na concentração de 10%. Para a mesma enzima, o DMSO apresentou efeitos de aumento na atividade (Kamini et al., 2000).

#### **8.4.4. Separação por ultrafiltração**

Como as metodologias cromatográficas não foram bem sucedidas para a purificação da lipase, estudou-se a eficiência do sistema de filtração molecular para a purificação. A partir do extrato precipitado, ressuspenso e ultrafiltrado, percebeu-se que as amostras retidas no sistema de ultrafiltração foram as únicas que apresentaram atividade (Figura 37), mostrando que a lipase tem maior peso molecular do que 10 kDa. Os dados vão de encontro com a literatura que reporta valores médios de peso molecular esperados para lipase de 30-50kDa (Sharma et al., 2001). Os dados também estão de acordo com os resultados observados na eletroforese (Figura 35).

Levando em consideração todas as estratégias adotadas até então, percebeu-se que aquelas em que se obteve maior sucesso na separação de diferentes frações de lipase contendo atividade foram: a precipitação de sulfato de amônio, a ultrafiltração e cromatografia de gel filtração. Sendo assim, a fim de se purificar a enzima para proceder a caracterização parcial das diferentes frações isoladas, decidiu-se combinar as estratégias nesta ordem apresentada.

#### **8.4.5. Purificação parcial das lipases através das técnicas padronizadas mais efetivas.**

Para a purificação final da enzima a partir de um novo cultivo de *M. spathulata* R25L270 em óleo de oliva deixou-se a etapa cromatográfica como a última metodologia. Durante a execução dessa etapa, ocorreu a mudança das condições experimentais. Na disponibilidade da ultracentrífuga para fazer o isolamento da fração precipitada pretendeu-se aumentar a força empregada na amostra para recolher a fração não recolhida à mais baixa rotação até então. Percebeu-se na execução dessa etapa que devido a isso o perfil das proteínas na cromatografia foi alterado (Figura 38).

Inicialmente percebeu-se que a cromatografia do extrato de 60% teve suas frações iniciais mais convolvidas, com menor resolução dos picos (Figura 38a). A purificação do extrato de 80% apresentou o ombro relativo às frações 3 a 7 muito aumentados (Figura 38b) em relação às outras cromatografias anteriores (Figuras 22–23; 32–33). Percebeu-se também a sobreposição das frações ativas com o cromatograma ficou bastante prejudicada.

Notou-se, que os picos de atividade não ficaram bem resolvidos, sobretudo para a fração de 80%. Então os picos de atividade mais elevada 9, 10, 11 e 12 foram

reunidos para a caracterização parcial. Também as frações 2 e 3 obtida a partir da precipitação inicial a 60% de saturação foram agrupadas para serem caracterizadas. Provavelmente esse efeito pode ter acontecido devido a uma agregação na coluna que ocorrera pela falta de sal no tampão de eluição (Healthcare, 2006).

Notou-se que o rendimento das metodologias para purificar as lipases das frações de 60 e 80% foram bastante similares, exceto para a etapa de filtração com amicon Tabela 15. Possivelmente a lipase fora inativada pela metodologia adotada.



Percebeu-se também que a purificação da amostra com 60% de saturação foi muito mais efetiva para a enzima dessa fração do que para a sua análoga de 80%, pois o fator de purificação foi superior para todas as etapas de purificação para essa fração quando em comparação com a outra.

A combinação de precipitação por sulfato de amônio e cromatografia de gel filtração proporcionou rendimento de 22% para a lipase de *Pythium ultimum* 144 (Mozaffar & Wette, 1993). As duas lipases de *Candida cylindracea* foram extraídas conjuntamente do meio de cultura através de precipitação com etanol apresentando 84% de rendimento (Rúa, et al., 1993). A lipase de *Rhizopus oryzae* foi purificada com rendimento de 80% (Hiol et al., 2000). Esses últimos valores são mais próximos dos encontrados para ambas as frações isoladas de *M. spathulata*.

A eletroforese das frações purificadas foi alterada para permitir maior visualização daquelas de maior massa molecular. Pela Figura 39 foi possível notar que não existiu mudança no padrão de proteínas dentro de uma mesma fração de saturação quando a amostra foi purificada através das técnicas empregadas. Notou-se também que o extrato de 80% de saturação possui bandas bastantes distintas do extrato de 60%, sugerindo que possa haver de fato a presença de diferentes lipases em cada um dos extratos. Porém, existiu uma banda consensual para frações advindas de ambos extratos de peso molecular ~55-60KDa, sugerindo esse como o peso molecular da lipase em cada fração.

As técnicas empregadas para purificação parcial de cada um dos extratos de *Moniliella spathulata*, estão presentes como as mais comumente encontradas em trabalho de revisão de purificação de lipases (Saxena et al., 2003, Sharma et al., 2001). A precipitação por sulfato de amônio é metodologia utilizada em mais de 40% dos casos como estratégia de concentração dessas proteínas (Saxena et al., 2003). Dentre as técnicas cromatográficas aquela que demonstrou maior eficiência, gel filtração, aparece como a mais utilizada em metodologias de purificação para 60% dos casos (Sharma et al., 2001).

Em metodologia utilizando de precipitação por sulfato de amônio e gel filtração, a lipase de *Bacillus stearothermophilus* AB-1 foi purificada parcialmente utilizando 60% de saturação no sobrenadante para isolar a enzima, resultado similar ao encontrado nesse trabalho (Abada, 2008). Para a purificação de lipase de *Pseudomonas*, foi utilizada a precipitação por sulfato de amônio a 60% de saturação para isolar a enzima com rendimento de 59%, cujo resultado foi melhorado para 83% empregando antiespumante Silicone 21 (Kanwar, et al., 2002).

Combinando precipitação em sulfato de amônio e cromatografia de troca iônica em coluna DEAE celulose, a lipase de *Microbacterium luteolum* foi parcialmente purificada 35,64 vezes com rendimento de 3,0%. O rendimento da etapa de precipitação alcançou 5,47% (Joseph, et al, 2012).

O emprego da metodologia de precipitação em sulfato de amônio e cromatografia de troca iônica em coluna DEAE celulose-32 para purificação de diferentes lipases de *Geotrichum* sp. SYBC WU-3 proporcionou rendimento de 20,4% para lipase A e 9,2% para lipase B (Cai, et al., 2009).

**Tabela 15– Rendimentos da purificação parcial padronizada de lipase a partir do cultivo com óleo de oliva**

, excetuando-se as variáveis “NaNO<sub>3</sub>”, “[N]” e “Sal KPO<sub>4</sub>”. Essas duas últimas variáveis apresentaram maiores valores de p-valor para a hipótese de que a presença delas no delineamento afetaria a produção da lipase por *M. spathulata* R25L270 (Figura 9).

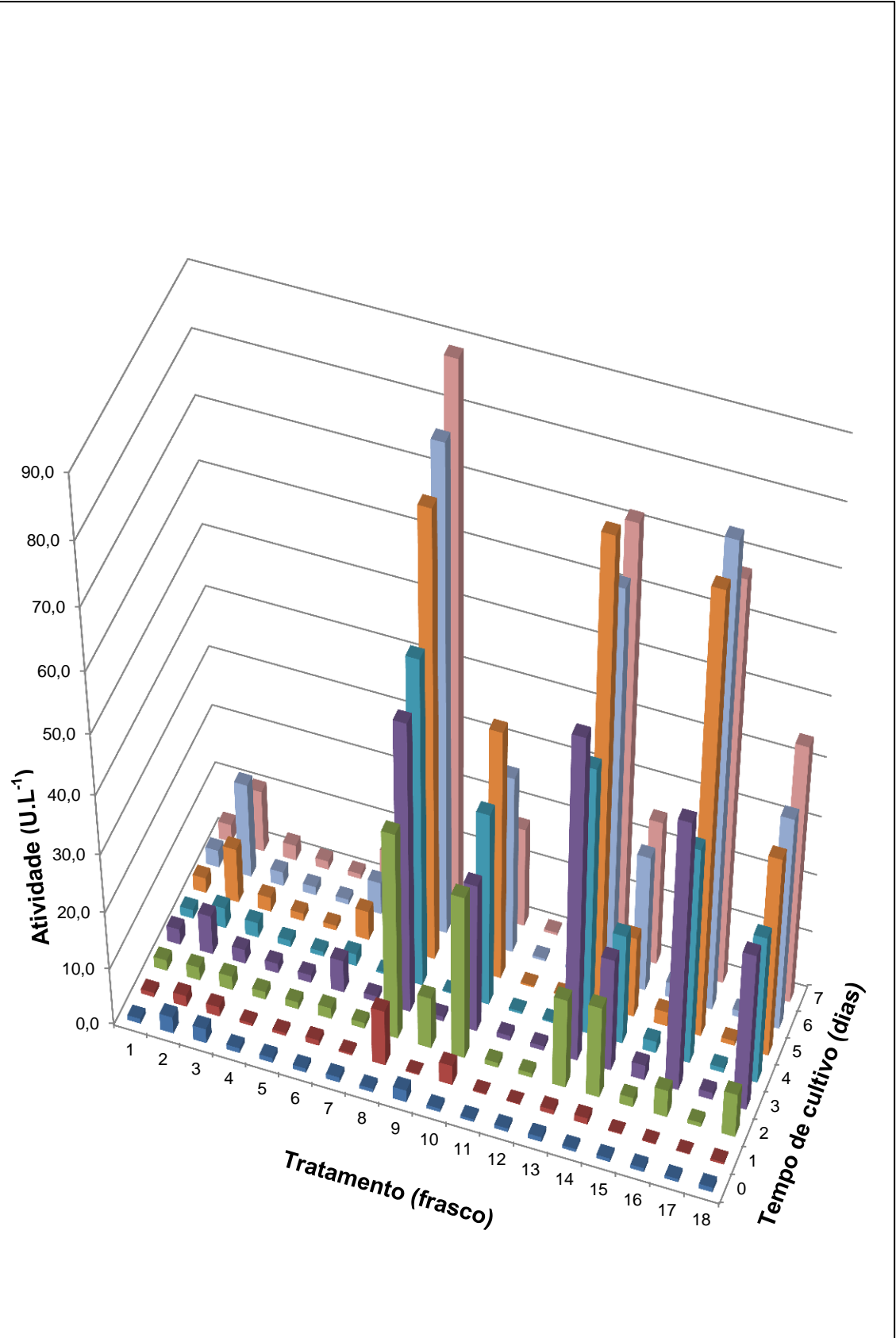
Além disso, notou-se pelo gráfico de efeitos da Figura 12, maior influência no aumento da atividade enzimática pela variável concentração da fonte de carbono e também maior aumento da atividade pelo emprego da fonte de nitrogênio 2, nitrato de sódio, pois, nesse caso, em relação às outras fontes de nitrogênio empregadas foi a que apresentou o menor p-valor (0,166).

**Tabela 4 – Resultados de atividade, densidade ótica, dosagem protéica e atividade normalizada por proteína para os diferentes tratamentos do delineamento de níveis mistos L18.**

Tratamento	Atividade Lipásica (U.L <sup>-1</sup> )	DO ( $\lambda_{600nm}$ )	Dosagem proteica (mg/L)	Atividade específica (U/mg)
1	3,027	0,09	1263	0,002397
2	10,559	0,37	1764	0,005984
3	2,609	0,17	1430	0,001825
4	1,468	0,24	1397	0,001051
5	0,859	0,54	1804	0,000476
6	6,299	2,00	1203	0,005235
7	0,555	-0,05	717	0,000775
8	88,802	1,53	3769	0,023562
9	0,384	-0,02	2973	0,000129
10	17,044	10,22	7233	0,002356
11	0,422	-0,05	2724	0,000155
12	0,555	0,31	2240	0,000248
13	71,723	5,52	1987	0,036102
14	24,918	3,03	1707	0,014601
15	2,669	0,63	1698	0,001572
16	67,657	5,90	1942	0,034835
17	1,164	0,26	1587	0,000734
18	44,165	1,56	2271	0,019447

**Tabela 5 – Atividade média da enzima para as concentrações dos níveis inferior e superior (U.L<sup>-1</sup>) do planejamento fatorial de níveis mistos da seção 3.1.2 para cada nível das variáveis.**

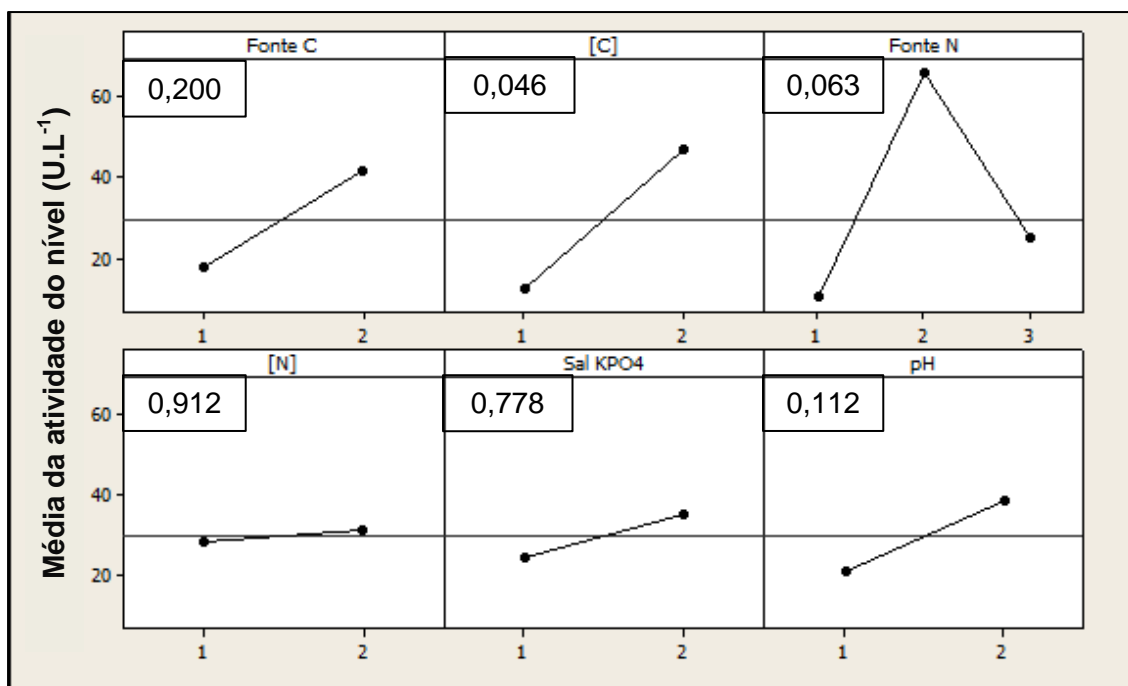
Nível	Fonte C	[C]	Fonte N	[N]	Sal KPO <sub>4</sub>	pH
A	10,8	5,50	4,74	17,9	16,9	8,65
B			18,6			
C	26,3	31,6	39,2	19,2	20,2	28,4
Variação	15,5	26,1	34,5	1,27	3,23	19,8



**Figura 8 – Variação da atividade enzimática microbiana em relação ao tratamento e o tempo de cultivo. As cores diferentes dos gráficos de barras expressam os dias de cultivo segundo o planejamento da Tabela 1.**

■ 0    ■ 1    ■ 2    ■ 3    ■ 4    ■ 5    ■ 6    ■ 7





**Figura 9 - Gráficos dos efeitos produzidos pelas médias dos níveis das variáveis na resposta de atividade lipásica.** Os valores p de cada variável encontram-se nas caixas anexas aos seus respectivos gráficos. Fonte N: 1=  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; 2=  $\text{NaNO}_3$ ; 3= uréia.

A partir desse pressuposto, observando a Tabela 6, percebeu-se que o valor de predição da resposta pelas variáveis experimentais testadas  $r^2 = 67,5\%$ , sugere que possa existir outras variáveis influenciando na resposta alcançada. Ainda assim percebeu-se que esse valor de coeficiente era minimamente satisfatório para rejeição de ao menos “Sal  $\text{KPO}_4$ ” e “[N]” devido aos seus elevados valores p preditos (Figura 9).

**Tabela 6 – Efeito das variáveis sobre a médias das atividades ( $\text{U.L}^{-1}$ ). O nível de confiança foi de 90% ( $p < 0,1$ )**

Termo	Coefficiente	EP(calc)	T	p
Constante	20,84	5,65	3,69	0,006
Fonte C 1	-7,75	5,55	-1,40	0,200
[C] 1	-13,1	5,55	-2,35	0,046
Fonte N 1	-16,1	7,70	-2,09	0,070
Fonte N 2	18,4	8,54	2,15	0,063
[N] 1	-0,634	5,55	-0,11	0,912
Sal $\text{KPO}_4$ 1	-1,62	5,55	-0,29	0,778
pH 1	-9,90	5,55	-1,79	0,112
$s^2 = 22,18$				
$r^2 = 67,5\%$				
<b>EP(calc) = erro padrão calculado; T = valor T calculado; P = valor p calculado para a variável; <math>s^2</math>= variância</b>				

Porém, para a exclusão da variável que menos explicasse a variação na atividade enzimática para o sétimo dia, excluiu-se a variável menos significativa e

manteve-se as demais. Sendo assim, foram consideradas significativas as variáveis “fonte C”; “[C]”, “fonte N”, “sal KPO<sub>4</sub>” e “pH”. Para um segundo experimento de otimização de deslocamento ascendente, decidiu-se por retestar essas variáveis.

Diversas das variáveis já escolhidas para o próximo passo de otimização poderiam não ter sido selecionadas caso a decisão para suas seleções fosse feita a partir do modelo predito, já que várias delas, pelo modelo, não se mostravam significativas (Figura 9). Isso ocorreria caso fossem excluídas as variáveis “fonte C”; “sal KPO<sub>4</sub>” e “pH” para ir para a próxima etapa de otimização.

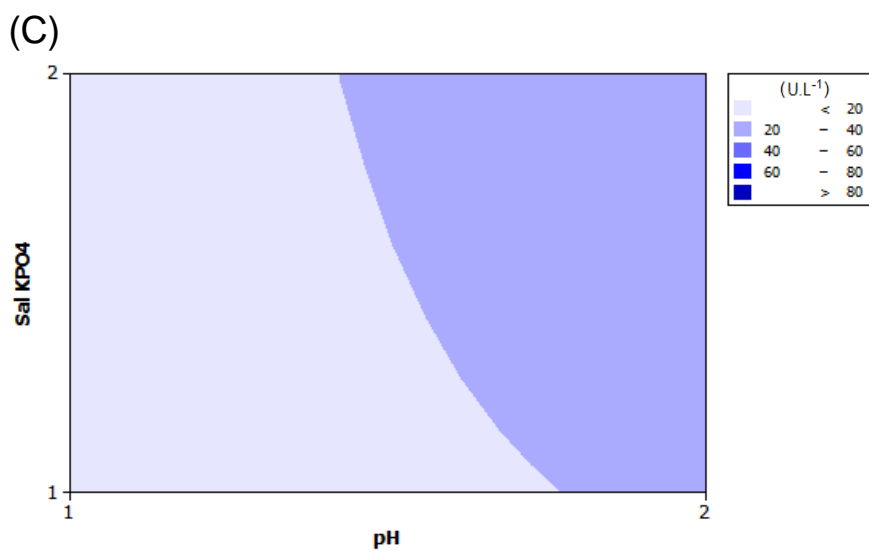
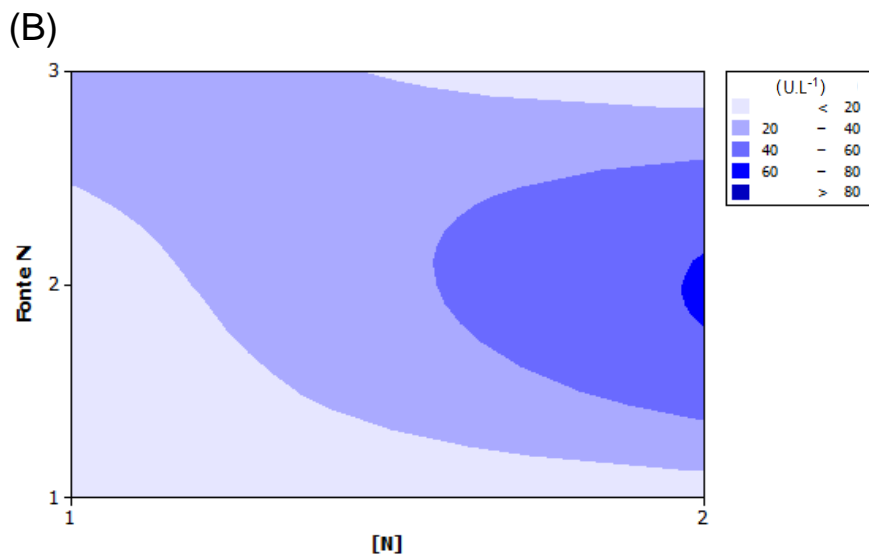
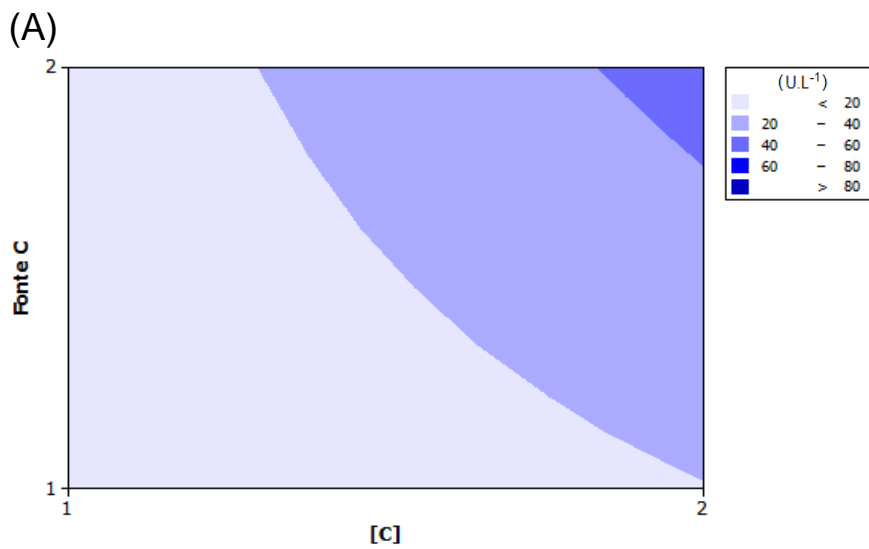
Sendo assim, preferiu-se decidir eliminar a variável menos significativa indicada pelo modelo “[N]” e continuar a testar aquelas outras indicadas pelo modelo como não significativas “fonte C”; “sal KPO<sub>4</sub>” e “pH” devido o ajuste do modelo predito não ter sido muito alto. Também percebeu-se que mais valia continuar testando uma variável não significativa cometendo erro do tipo I do que correr o risco de eliminar do planejamento fatorial uma variável significativa (erro do tipo II) o que constituiria um grande equívoco.

O modelo descrito para os dados estudados pôde ser descrito pelas variáveis significativas mostradas na Tabela 6. Denotando [C] = a; Fonte N (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = b; Fonte N NaNO<sub>3</sub> = c; e a constante com seu valor nominal, proporcionou:

$$\text{Atividade (U.L}^{-1}\text{)} = 20,8 - 13,1 a - 16,1 b - 18,4 c$$

Uma demonstração gráfica dos efeitos causados pelas variáveis testadas na atividade enzimática é possível pelos gráficos de efeito (Figura 10). Eles mostraram menor contribuição das variáveis “Fonte N”; “Sal KPO<sub>4</sub>” e “pH” para explicar a atividade enzimática. Para as variáveis “Sal KPO<sub>4</sub>” e “pH”, houve baixa correlação entre a mudança de seus níveis refletindo na alteração na atividade enzimática (gráfico C), efeito mais pronunciado nos gráficos A e B da Figura 10. Para o gráfico B, percebeu-se de que a variável concentração da fonte de nitrogênio pode ter efeito de segunda ordem quando analisada em uma combinação com a fonte de nitrogênio nitrato de sódio empregada. Isso, porém, não é visto para as fontes 1 e 3 (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> e Uréia), possivelmente porque essas fontes não interferem incentivando a produção global de lipase. Portanto a atividade enzimática não sofre alteração na presença delas.

No estudo de fatorial de níveis mistos L18 de *M. spathulata* R25L270 também foi analisado o efeito das variáveis na densidade ótica (DO) para o sétimo dia de



**Figura 10 – Curva de contorno da influência das variáveis de estudo na atividade enzimática.** (A)= Fonte de carbono versus concentração da fonte de carbono; (B)= Fonte de nitrogênio versus concentração da fonte de nitrogênio; (C)= fosfato de potássio versus pH.

cultivo. Nessa análise, notou-se um perfil de resultados bastante distinto daquele obtido para as atividades. Percebeu-se pelo gráfico mudanças nos perfis de influência das variáveis “[N]” e “pH” (Figura 11) sobre a densidade ótica. Na análise anterior percebeu-se maiores atividade enzimática quanto maiores foram os níveis dessas variáveis. Percebeu-se também maior significância estatística do fosfato de potássio para explicar a resposta para densidade ótica (DO).

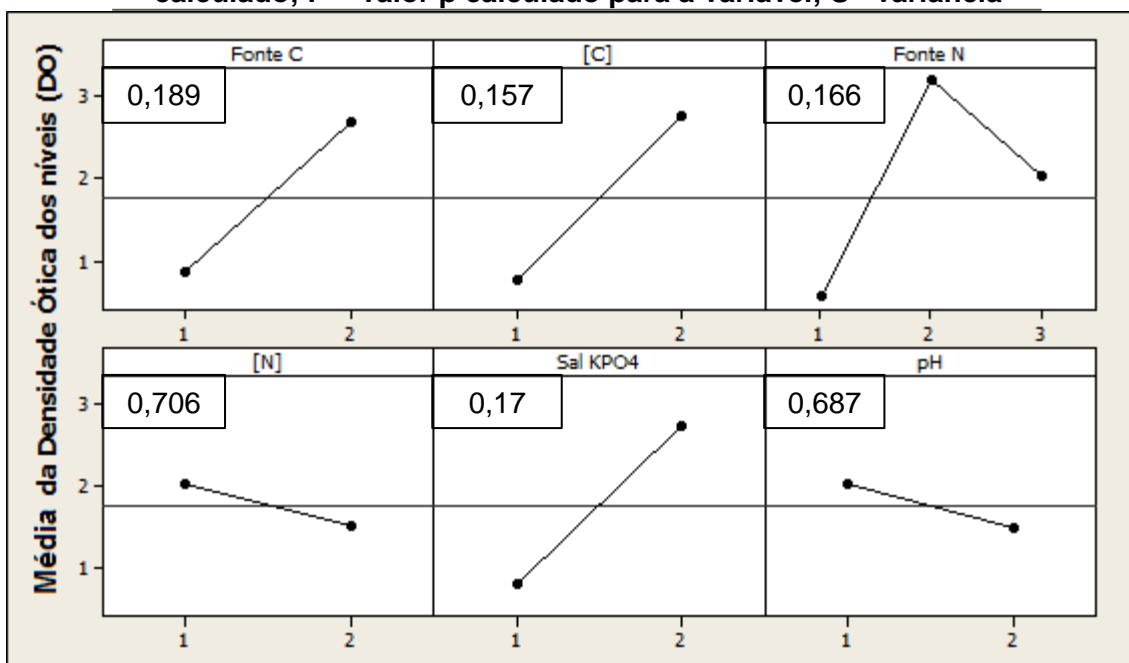
Ainda que existiram variações na densidade ótica representadas pelos gráficos (Figura 11), nenhuma das variáveis explicaram a densidade celular do cultivo devido ao  $p > 0,1$  (Tabela 7).

**Tabela 7 – Efeito das variáveis sobre a médias das densidades óticas (DO). O nível de confiança foi de 90% ( $p < 0,1$ ).**

Termo	Coeficiente	Coef. erro	T	p
Constante	1,92	0,650	2,95	0,018
Fonte C 1	-0,91	0,638	-1,44	0,189
[C] 1	-0,99	0,638	-1,56	0,157
Fonte N 1	-1,35	0,886	-1,53	0,166
Fonte N 2	1,26	0,983	1,28	0,235
[N] 1	0,25	0,638	0,391	0,706
Sal KPO <sub>4</sub> 1	-0,96	0,638	-1,51	0,170
pH 1	0,27	0,638	0,419	0,687

$S^2 = 2,55$   
 $r^2 = 54,8\%$

**Coef. Erro = valor nominal do erro calculado; T = valor T calculado; P = valor p calculado para a variável; S= variância**



**Figura 11- Efeitos das médias dos níveis das variáveis na resposta de DO.** Os valores p de cada variável encontram-se nas caixas anexas aos seus respectivos gráficos e os valores numéricos representam os níveis das mesmas. Fonte N: 1= NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>; 2= NaNO<sub>3</sub>; 3= uréia.

Apenas a constante do modelo ajustado explicaria a densidade ótica ( $p$ -valor= 0,018) uma vez que nenhum dos parâmetros estudados influenciou a DO do meio. Dessa forma, o modelo que melhor se ajustou à densidade ótica para o sétimo dia de cultivo foi expresso por:

$$\text{Densidade Ótica } (DO_{\lambda 600nm}) = 1,91$$

A predição das variáveis que influenciam a dosagem pelo modelo mostrou que somente a variável concentração da fonte de carbono influenciava significativamente a produção protéica como mostrou a Tabela 8.

**Tabela 8 - Efeito das variáveis sobre a médias para médias das dosagens protéicas ( $\mu\text{g/mL}$ ). O nível de confiança foi de 90% ( $p < 0,1$ ).**

<b>Termo</b>	<b>Coeficiente</b>	<b>Coef. erro</b>	<b>T</b>	<b>p</b>
Constante	2204	315,1	6,996	0
Fonte C 1	-429,9	309,5	-1,389	0,202
[C] 1	-604,8	309,5	-1,954	0,086
Fonte N 1	-727,5	429,5	-1,694	0,129
Fonte N 2	-344,0	476,4	-0,722	0,491
[N] 1	444,9	309,5	1,438	0,188
Sal $\text{KPO}_4$ 1	-81,32	309,5	-0,263	0,799
pH 1	55,07	309,5	0,178	0,863
$S^2 = 1238$				
$r^2 = 64,9\%$				
<b>Coef. Erro = valor nominal do erro calculado; T = valor T calculado; P = valor p calculado para a variável; <math>S^2</math>= variância</b>				

Percebeu-se pelos resultados que a levedura de estudo não discriminou o tipo da fonte de carbono como determinante para a produção de suas proteínas (Tabela 7) quando isso acontece para a atividade enzimática (Tabela 6), pode se esperar que a levedura produza mais enzimas ativas.

Sendo assim, possivelmente a produção da lipase esteja ligada a concentração da fonte de carbono existente no meio, pois na presença do menor nível dessa variável no delineamento, menos proteína foi detectada em relação à média global e também menor atividade lipásica no sobrenadante foi observada.

Em relação à concentração protéica do meio, o modelo que melhor se ajustou aos dados estudados pôde ser descrito pelas variáveis significativas mostradas na Tabela 8. Denotando [C] = d; e a constante com seu valor nominal, obteve-se:

$$\text{Concentração proteica } (\mu\text{g/mL}) = 2204 - 604,8 d$$

Analisada a Figura 12, também se percebeu maior associação entre a produção de proteína e uréia, diferindo dos dados tanto de atividade lipásica e densidade ótica influenciadas para a fonte de nitrogênio já que, para aquelas variáveis, houve melhor associação para o nitrato de sódio.

Uma nova análise fora feita para as respostas advindas dos dados da atividade normalizada, ou seja, a razão atividade sobre dosagem protéica. Interessantemente, para as respostas das variáveis concentração da fonte de carbono e pH mostradas na Figura 13 mostraram que quanto maiores eram os níveis das variáveis, maiores eram as respostas.

O efeito atividade normalizada estudada se trata de uma razão numérica na qual a dosagem protéica é o denominador. Sendo assim elevadas médias para atividade enzimática causadas pelo efeito de uma variável aliadas à baixas médias para dosagem proteica para essa mesma variável, acarretaria em altos efeitos para associar essa variável à atividade normalizada. Sendo assim a Figura 13 pode ser melhor compreendida.

A fonte nitrato de sódio (Figura 12, fonte B da tabela 3) apresentou efeito menos pronunciado para explicar a dosagem protéica em relação à fonte 3, uréia, naquele gráfico. Também nitrato de sódio foi a fonte mais significativa para explicar a atividade enzimática (Figura 9).

Logo para os dados da atividade normalizada, a fonte de nitrogênio nitrato de sódio foi a mais significativa ( $p=0,005$ , Tabela 9) para explicar o aumento da atividade normalizada dentre as demais no planejamento experimental (Figura 13).

**Tabela 9 – Coeficientes de regressão para médias das atividades das enzimas lipases normalizadas pela dosagem protéica (U.L/ $\mu$ g)**

<b>Termo</b>	<b>Coeficiente</b>	<b>Coef. erro</b>	<b>T</b>	<b>p</b>
Constante	0,00904	0,00185	4,90	0,001
Fonte C 1	-0,00232	0,00181	-1,28	0,236
[C] 1	-0,00450	0,00181	-2,48	0,038
Uréia	-0,00620	0,00252	-2,47	0,039
NaNO <sub>3</sub>	0,01070	0,00279	3,84	0,005
[N] 1	-0,00198	0,00181	-1,09	0,306
Sal KPO <sub>4</sub> 1	-0,00170	0,00181	-0,94	0,375
pH 1	-0,00369	0,00181	-2,04	0,076

$$S^2 = 0,007251$$

$$r^2 = 78,3\%$$

**Coef. Erro = valor nominal do erro calculado; T = valor T calculado; p = valor p calculado para a variável; S= variância.**

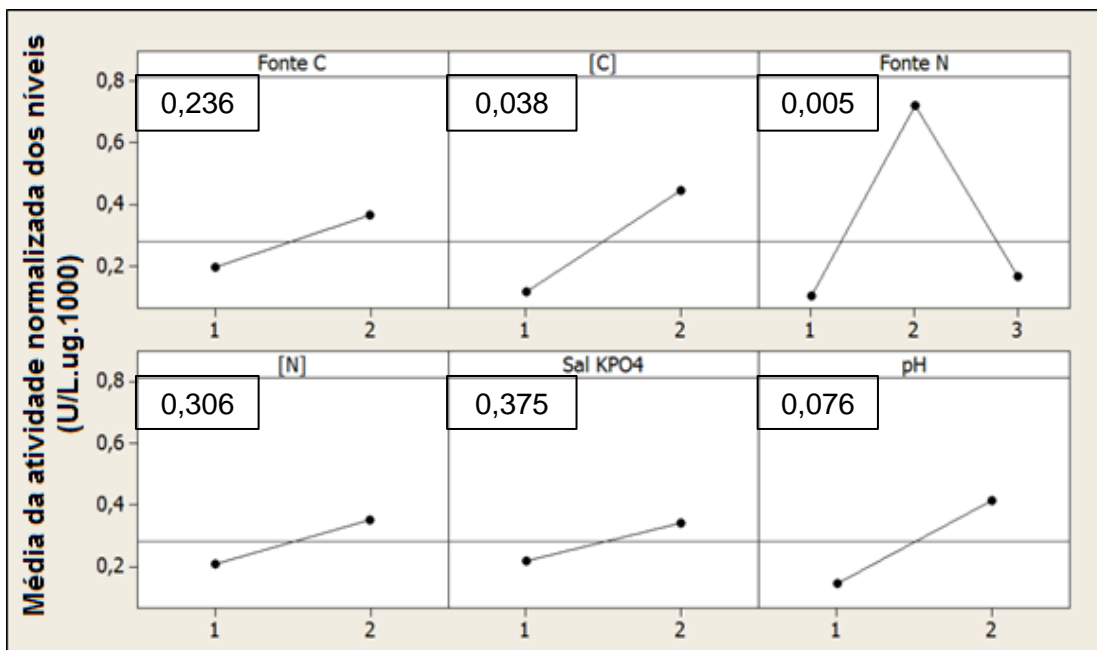


Figura 12 - Efeitos das médias dos níveis das variáveis na resposta de dosagem protéica. Os valores p de cada variável encontram-se nas caixas anexas aos seus respectivos gráficos e os valores numéricos representam os níveis das mesmas. Fonte N: 1=  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; 2=  $\text{NaNO}_3$ ; 3= uréia.

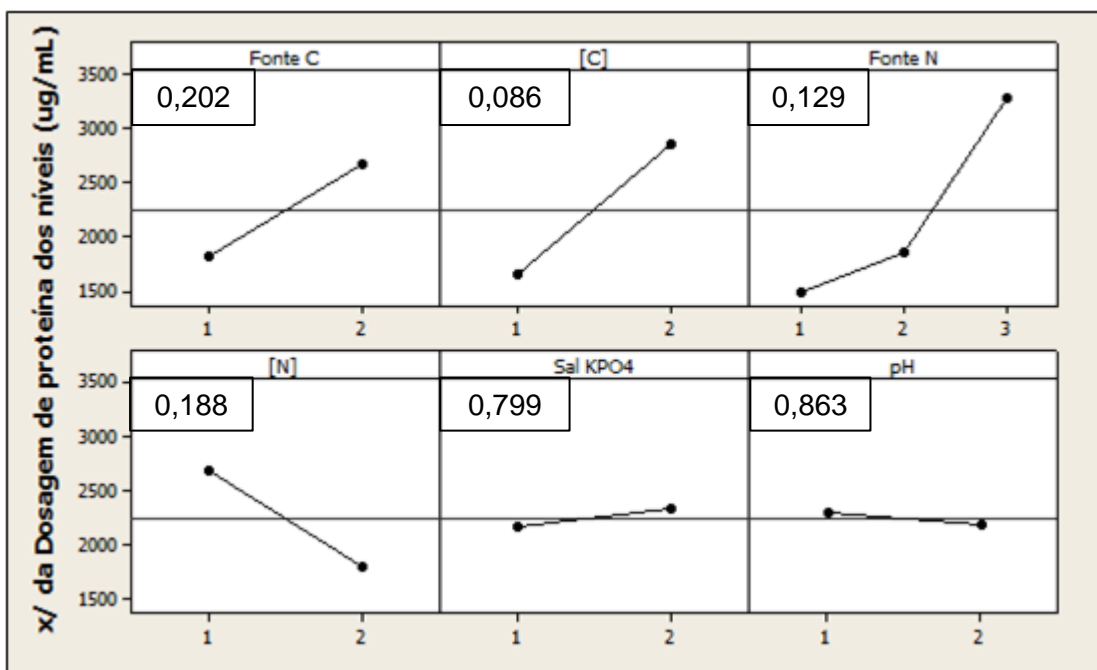


Figura 13 - Efeitos das médias dos níveis das variáveis na resposta de atividade normalizada. Os valores p de cada variável encontram-se nas caixas anexas aos seus respectivos gráficos e os valores numéricos representam os níveis das mesmas. Fonte N: 1=  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; 2=  $\text{NaNO}_3$ ; 3= uréia.

Isso implica que sua utilização em um próximo delineamento, além de serem esperados valores totais de atividade lipásica mais elevados, espera-se que a lipase seja encontrada em um sistema menos heterogêneo, facilitando possivelmente subsequentes purificações do catalisador.

Para a resposta de atividade específica, o modelo que melhor se ajustou aos dados estudados pôde ser melhor descrito pelas variáveis significativas mostradas na Tabela 9. Denotando [C] = e; Fonte de N1 (sulfato de amônio) = f; Fonte de N2 (nitrato de sódio) = g e pH = h e a constante com seu valor nominal, obteve-se:

$$\begin{aligned} \text{Atividade normalizada} \left( \frac{U}{\mu\text{g} \cdot 10^3} \right) \\ = 0,00904 - 0,00450e - 0,00620f + 0,01070g - 0,00369h \end{aligned}$$

Pela metodologia de fatoriais de níveis mistos, foi possível aqui eliminar uma das seis variáveis estudadas no primeiro planejamento fatorial. Também se rejeitou a hipótese da significância das variáveis uréia e nitrato de amônio como fontes de nitrogênio e também glicerol como fonte de carbono como as mais significativas para explicar a atividade enzimática, resposta escolhida para a otimização devido a capacidade de conversão de óleo em biodiesel ser determinado por essa resposta.

Na otimização da produção de lipase por *Pseudomonas aeruginosa* B-3556 utilizando da metodologia de Taguchi objetivou-se estimar variáveis e os ruídos com dois níveis que influenciavam os processos para aumentar a robustez do processo (Sabbaghian & Roostaazad, 2005).

Pelo estudo ocorreu redução dos 9 variáveis estudadas inicialmente para apenas 4 na segunda repetição da metodologia. Outra aplicação do planejamento fatorial de níveis mistos acarretou na diminuição de iniciais 8 ( $7^3+1^2$ ) variáveis para 4 ( $4^3$ ) variáveis que se mostraram significativos para a resposta pretendida. Essas variáveis foram submetidas a um delineamento composto central rotacional (Yu et al., 2007).

No caso da otimização da produção de lipase através da busca das variáveis que explicavam a atividade lipásica, observou-se que a melhor condição na qual a lipase pôde ser produzida foi aquela em que a [C] = 6%; fonte de carbono = óleo de oliva; pH = 8,0, fonte de nitrogênio =  $\text{NaNO}_3$ ; e  $[\text{KPO}_4]$  = 1%. Como percebeu-se baixa influência da variável [N] na atividade lipásica excluiu-a para um próximo delineamento, mantendo as demais variáveis junto à nova etapa de otimização.



## 8.5. Otimização do cultivo: Delineamento Fatorial completo ( $2^k + 1$ )

### 8.5.1. Otimização para Óleo de Oliva

O delineamento de fatorial completo ( $2^k+1$ ), com quatro repetições no ponto central, mostrado no ítem 3.1.3 foi empregado para serem selecionadas as variáveis, seus níveis e também o efeito possível da combinação das variáveis em primeira, segunda ou até terceira ordem que interferiam a atividade enzimática de *M. spathulata* R25L270. As variáveis e níveis utilizados nessa seção foram estipulados a partir do ítem 4 – fatorial de níveis mistos.

Utilizou-se de um meio base para cultivo com concentrações fixas de nitrato de sódio a 0,1% e peptona 0,3% e concentrações variáveis de fonte de carbono (3 e 9%) (óleo de oliva ou glicerol); fosfato de potássio (0,1 e 1,5%), além do pH (6,5 e 8,0) (Tabela 10). Verificam-se na Tabela 10 também os resultados de atividade emulsificante e atividade lipásica.

**Tabela 10 – Delineamento fatorial completo ( $2^3+1$ ) com 4 repetições no ponto central para seleção das variáveis (codificadas e não codificadas) que influenciam nas respostas de atividade e atividade emulsificante de *Moniliella spathulata* R25L270 com glicerol e óleo de oliva como fontes de carbono.**

Ensaio	Codificadas			Não codificadas			Atividade (U.L <sup>-1</sup> ) óleo de oliva	Atividade emulsificante (%)	Atividade (U.L <sup>-1</sup> ) glicerol
	[C]	pH	PO <sub>4</sub>	[C]	pH	PO <sub>4</sub>			
1	-1	-1	-1	3	6,5	0,1	31,6282	84,00	0,6086
2	1	-1	-1	9	6,5	0,1	26,1317	86,67	0,1902
3	-1	1	-1	3	8	0,1	11,6585	93,33	0,7037
4	1	1	-1	9	8	0,1	26,8735	84,00	0,1711
5	-1	-1	1	3	6,5	1,5	9,5094	86,67	0,1902
6	1	-1	1	9	6,5	1,5	10,118	85,33	0,000
7	-1	1	1	3	8	1,5	0,6657	86,67	0,1522
8	1	1	1	9	8	1,5	-1,3503	52,00	0,3233
9	0	0	0	6	7,25	0,8	15,5954	86,67	0,1141
10	0	0	0	6	7,25	0,8	7,2461	88,00	0,2282
11	0	0	0	6	7,25	0,8	6,3332	94,67	0,1522
12	0	0	0	6	7,25	0,8	7,1701	86,67	0,1712

A análise de variância para os valores reais de atividade emulsificante, a 10 % de significância ( $p>0,1$ ) para o décimo primeiro dia de cultivo revelou que nenhum dos componentes do meio se apresentaram como variáveis significativas para a atividade surfactante (Tabela 11).

Sobre os dados de atividade emulsificante do Tabela 11, percebeu-se pouca variação nos resultados ( $r^2 = 47,8\%$ , Tabela 11), exceto para o frasco 8. A média, ou constante (Tabela 11), foi o único item que apresentou confiabilidade estatística ( $p < 0,1$ ). Indicando que independente dos níveis das variáveis, obteve-se um valor médio de emulsificante nos frascos de 82,3%.

Em relação às atividades enzimáticas para o dia em que foi encontrada a maior atividade, quinto dia, para o mesmo nível de significância de 10%, foi encontrado que as variáveis fontes  $PO_4$  e pH possuíam maior significância estatística para explicar a produção de lipase através dos seus respectivos p-valores, de 0,001 e 0,021 (Tabela 12). Nenhum efeito de segunda ordem pôde ser observado para essas variáveis.

Inicialmente o ajuste do modelo não apresentou significância estatística quando incluía a variável [C]. Assim, um novo modelo foi gerado excluindo essa variável e mantendo as demais, levando a um melhor ajuste desse novo modelo que, por sua vez, apresentou que 84,7% dos valores de atividade foram explicados pela alteração dos níveis das variáveis para o modelo linear.

**Tabela 11 – Coeficientes de regressão e tabela ANOVA para médias da porcentagem de emulsificante ( $\%_{(v/v)}$ ) no décimo primeiro dia do planejamento fatorial completo com óleo de oliva.**

Fonte de variac	Grau Liber	Soma Quad	Soma Quad Ajust	Média Quad Ajust	Efeito	Coef	Erro padr Coef	F	T	p
Const	3	490,67	490,67	163,56		82,3	3,4	1,72	23,9	0,000
[C]	1	227,56	227,56	227,56	-10,7	-5,3	3,4	2,39	-1,6	0,166
pH	1	88,89	88,89	88,89	-6,7	-3,3	3,4	0,94	-1,0	0,366
$PO_4$	1	174,22	174,22	174,22	-9,3	-4,7	3,4	1,83	-1,4	0,218
Curv	1	118,52	118,52	118,52		6,7	6,0	1,25	1,1	0,301
Erro Res	7	665,33	665,33	95,05						
Erro Ajust	4	621,33	621,33	155,33					10,59	0,041
Erro puro	3	44	44	14,67						
Total	11	1274,52								
$S^2 = 9,7$										
$r^2 = 47,8\%$										
<b>Variac=variação; Trat=tratamento; Liber=liberdade; Soma Quad=soma quadrática; Ajust=ajustado; Padr=padrão; Curv=curvatura; Coef=Coeficiente; F=valor F; T=valor T; p=valor p.</b>										

Percebeu-se que a concentração da fonte de carbono não foi determinante para explicar a atividade lipásica no cultivo utilizando óleo de oliva (Tabela 12), contrariando as análises do primeiro delineamento fatorial de níveis mistos (item 4.2) em que essa variável era tida como significativa (Tabela 6). Notou-se também que embora o pH e o fosfato tenham aparecido como significativos para o fatorial completo (Tabela 12), eles não foram apontados como variáveis candidatas a otimização no experimento de fatorial de níveis mistos se fosse pretendido eliminar todas as variáveis não significativas indicadas ao invés de eliminar a variável menos significativa, como foi feito (Tabela 6).

O modelo matemático que melhor descreveu os dados de atividade desse delineamento pôde ser descrito a partir dos dados da Tabela 12 com a seguinte equação:

$$\text{Atividade (U.L}^{-1}\text{.s}^{-1}\text{)} = 73,23 - 6,59 i - 13,81 j$$

na qual denominou-se pH = i e a concentração do sal de fosfato = j.

**Tabela 12 – Coeficientes de regressão e tabela ANOVA para as médias das atividades (U.L<sup>-1</sup>) para o quinto dia de cultivo do planejamento fatorial completo com óleo de oliva.**

Trat	Grau Liber	Soma Quad	Soma Quad Ajust	Média Quad Ajust	Efeito	Coef	Erro padr Coef	F	T	p
Const	2	943,29	943,29	471,64		14,4	1,72	19,84	8,36	0,000
pH	1	195,43	195,43	195,43	-9,89	-4,94	1,72	8,22	-2,87	0,021
PO <sub>4</sub>	1	747,86	747,86	747,86	-19,3	-9,67	1,72	31,45	-5,61	0,001
Curv	1	75,42	75,42	75,42		-5,32	2,99	3,17	-1,78	0,113
Erro Res	8	190,22	190,22	23,778						
Erro Ajust	1	0,15	0,147	0,147				0,01		0,943
Erro puro	7	190,08	190,08	27,154						
Total	11	1208,93								
$S^2 = 4,88$										
$r^2 = 84,3\%$										

**Const= constante; Trat=tratamento; Liber=liberdade; Soma Quad=soma quadrática; Ajust=ajustado; Padr=padrão; Curv=curvatura; Coef=Coeficiente; F=valor F; T=valor T; p=valor p.**

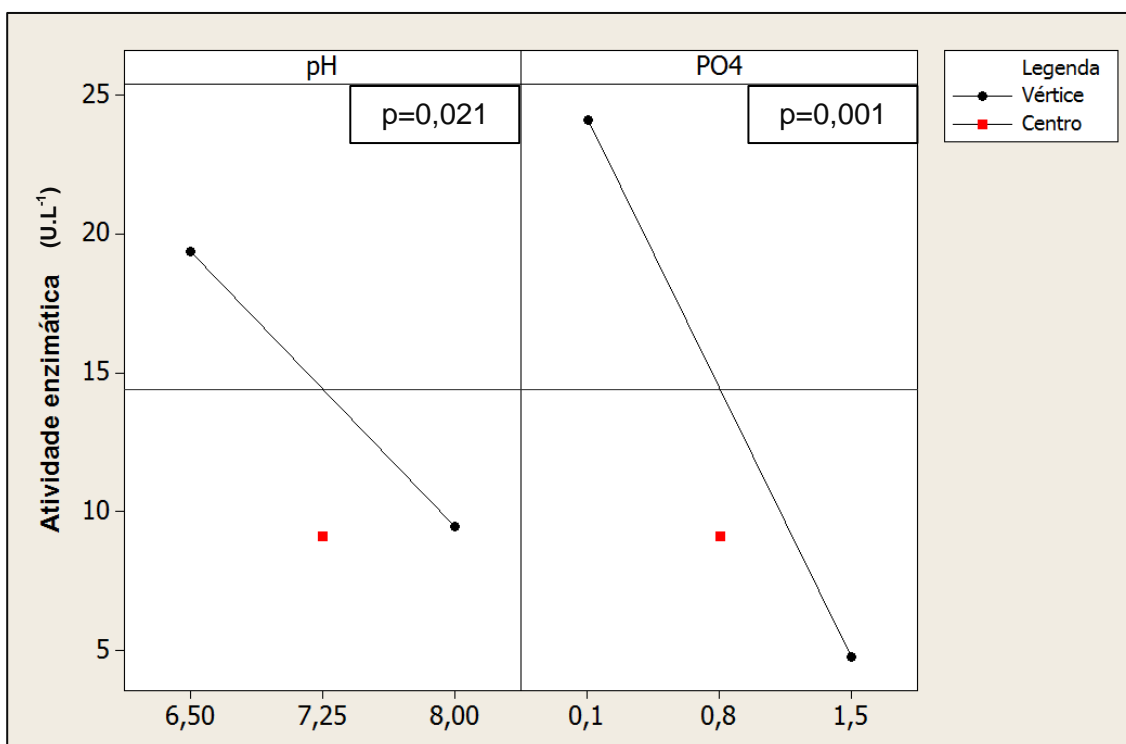
Observou-se uma significativa influência das variáveis pH e fosfato para explicar o aumento da atividade enzimática visto o incremento que é proporcionado na atividade quando qualquer uma das duas variáveis é diminuída (Figura 14).

Sabe-se que tanto mais é confiável um planejamento fatorial, quando as condições para serem feitas as análises são melhor planejadas e executadas.

Eliminou-se assim a realização de experimentos desnecessários por serem excluídas combinações a serem testadas inutilmente, quando, por exemplo, as variáveis a serem experimentados não produzem efeito na variável resposta.

Dessa forma, selecionam-se e testam-se apenas aquelas variáveis que produzem resultados efetivos, economizando tempo, reagentes e outros capitais. Assim, tendo em vista as condições disponíveis na primeira situação de análise do experimento fatorial de níveis mistos, tomaram-se as decisões mais conservadoras naquela etapa tendo em vista não serem cometidos erros do tipo II ao eliminar o  $\text{PO}_4$  ou o pH por exemplo.

Preferiu-se arriscar em cometer o risco de erro de manter um fator com um efeito não significativo, levando-o para um próximo delineamento em cujo planejamento experimental seu efeito poderia ser melhor analisado. A eliminação errônea impediria que a eficácia do efeito da variável fosse atestada em um experimento seguinte. Assim, eliminou-se somente, a variável concentração da fonte de nitrogênio que não foi testada no planejamento fatorial completo.



**Figura 14 – Efeitos das médias dos diferentes níveis das variáveis pH e  $\text{PO}_4$  na resposta de atividade enzimática para o cultivo de *Moniliella spathulatha* R25L270 com fonte de carbono óleo de oliva no delineamento fatorial completo. Os valores p de cada variável encontram-se nas caixas anexas a de seus respectivos gráficos.**

### 12.3.2.Otimização para Glicerol

O delineamento de fatorial completo ( $2^k+1$ ), com quatro repetições no ponto cental, mostrado no ítem 3.1.3 também foi selecionado para otimização de glicerol. Utilizou-se de um meio base para cultivo com concentrações fixas de nitrato de sódio a 0,1% e peptona 0,3% e concentrações variáveis de fonte de carbono (óleo de oliva ou glicerol); fosfato de potássio, além do pH (Tabela 10).

Percebeu-se que as variáveis [C], pH e  $PO_4$  foram significativas para explicar a variação da atividade lipásica (p-valores 0,003; 0,099 e 0,003, respectivamente). Também interações de segunda ordem com  $[C]*PO_4$  e terceira ordem  $[C]*pH*PO_4$  foram significativas para explicar essa mesma variação (p-valores 0,005 e 0,047) (Tabela 13).

**Tabela 13 – Coeficientes de regressão e tabela ANOVA para as médias das atividades ( $U.L^{-1}$ ) para o quinto dia de cultivo do planejamento fatorial completo com glicerol.**

Trat	GL	SQ	SQA	MQA	Efeito	Coef	EPC	F	T	p
CsT	3	0,27219	0,27219	0,09073		0,29	0,0235	20,48	12,3	0
[C]	1	0,12226	0,12226	0,12226	-0,247	-0,124	0,0235	27,59	-5,25	0,003
pH	1	0,01809	0,01809	0,01809	0,0951	0,0475	0,0235	4,08	2,02	0,099
$PO_4$	1	0,13184	0,13184	0,13184	-0,257	-0,128	0,0235	29,76	-5,45	0,003
$[C]^*$ $PO_4$	1	0,10417	0,10417	0,10417	0,228	0,114	0,0235	23,51	4,85	0,005
$[C]^*$ $pH^*$ $PO_4$	1	0,10417	0,10417	0,10417	0,124	0,0618	0,0235	6,9	2,63	0,047
Curv	1	0,03057	0,03057	0,03057		-0,124	0,0408	9,2	-3,03	0,029
Erro Res	1	0,03057	0,03057	0,03057						
Erro Ajust	1	0,04075	0,04075	0,04075				3,4		0,169
Erro puro	5	0,02216	0,02216	0,00443						
Total	2	0,01537	0,01537	0,00767						

$$S^2 = 0,066$$

$$r^2 = 95,28\%$$

**CsT= constante; Trat=tratamento; GL=graus de liberdade; SQ=soma quadrática; SQA= soma quadrática ajustado; SQM= soma quadrática média; EPC=erro padrão do coeficiente; Curv=curvatura; F=valor F; T=valor T; p=valor p.**

Inicialmente o ajuste do modelo não apresentou significância estatística quando foram consideradas as interações de  $[C]*pH$  e  $pH*PO_4$ . Assim, um novo modelo foi gerado excluindo a contribuição dessas interações e mantendo as demais, levando a um melhor ajuste.

Esse novo modelo explicou 95,28% (Tabela 13) da variação da atividade através da alteração dos níveis das variáveis, além de ter apresentado o erro de ajustamento não significativo  $p > 0,1$ .

Analisado o modelo, descreveu-se a notação matemática mais adequada para a atividade enzimática pode ser expressa como:

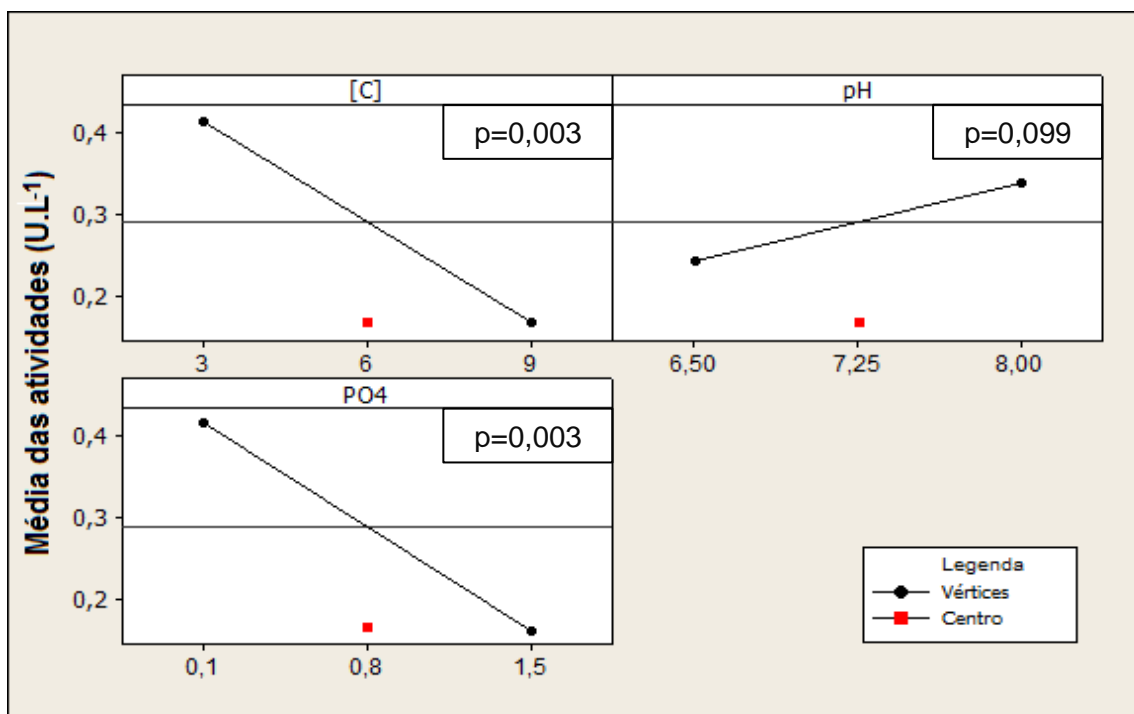
$$(U.L^{-1}) = 0,290 - 0,124 k + 0,048 l - 0,128 m + 0,114 n + 0,062 o,$$

denotadas as variáveis  $[C] = k$ ;  $pH = l$ ;  $PO_4 = m$ ;  $[C]*PO_4 = n$  e  $[C]*pH*PO_4 = o$

O valor médio da atividade enzimática foi menor em comparação com os cultivos utilizando óleo de oliva (Tabela 10), o que está em concordância com os dados observados no delineamento fatorial de níveis mistos do item 4.

Percebeu-se que o efeito de combinação da concentração de carbono e fosfato foi muito mais determinante no nível mais baixo dessa fonte enquanto no nível mais alto, o efeito da combinação sugeriu ser quase nulo (Figura 16).

A melhor condição para a produção de lipase por *M. spathulatha* foi encontrada em pH mais elevado e menor concentração de glicerol como fonte de carbono e menor



**Figura 15 - Efeitos das médias dos diferentes níveis das variáveis [C], pH e PO<sub>4</sub> na resposta de atividade enzimática para o cultivo de *Moniliella spathulatha* R25L270 com fonte de carbono glicerol no delineamento fatorial completo. Os valores p de cada variável encontram-se nas caixas anexas a de seus respectivos gráficos.**

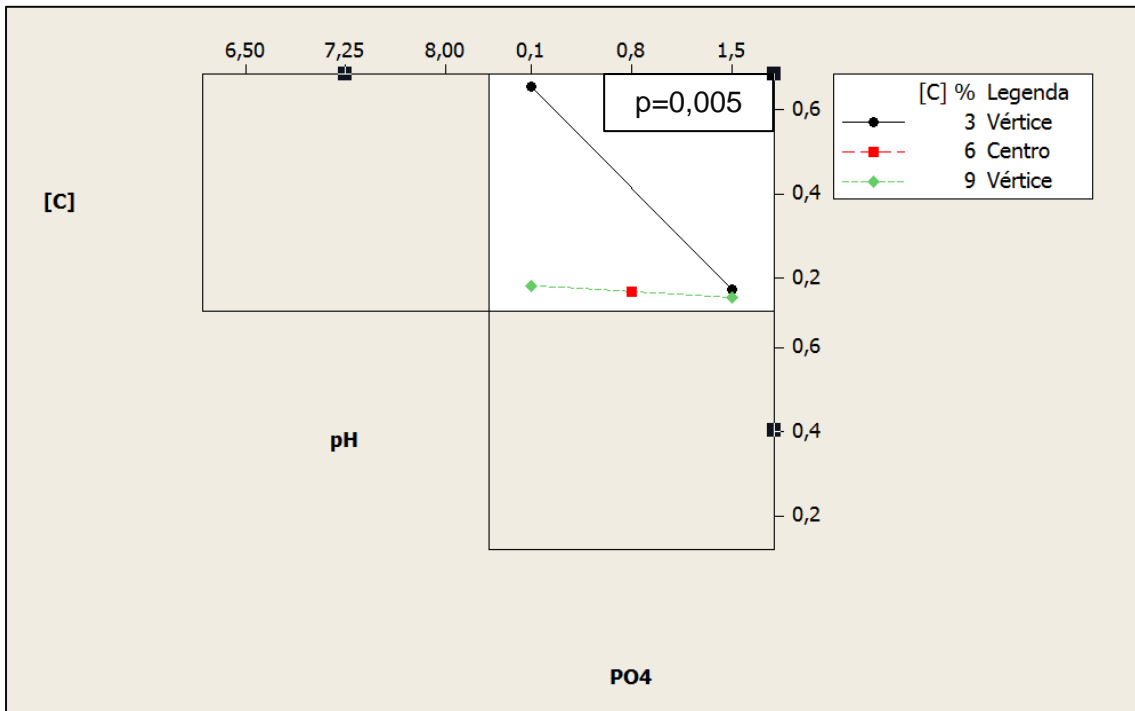


Figura 16 – Efeito de interação de segunda ordem das variáveis [C] e PO4 em combinação significativa sobre a atividade enzimática do sobrenadante de *Moniliella spathulatha* R25L270 para o quinto de cultivo. O valor p do efeito da interação encontra-se na caixa anexa a de seu respectivo gráfico.

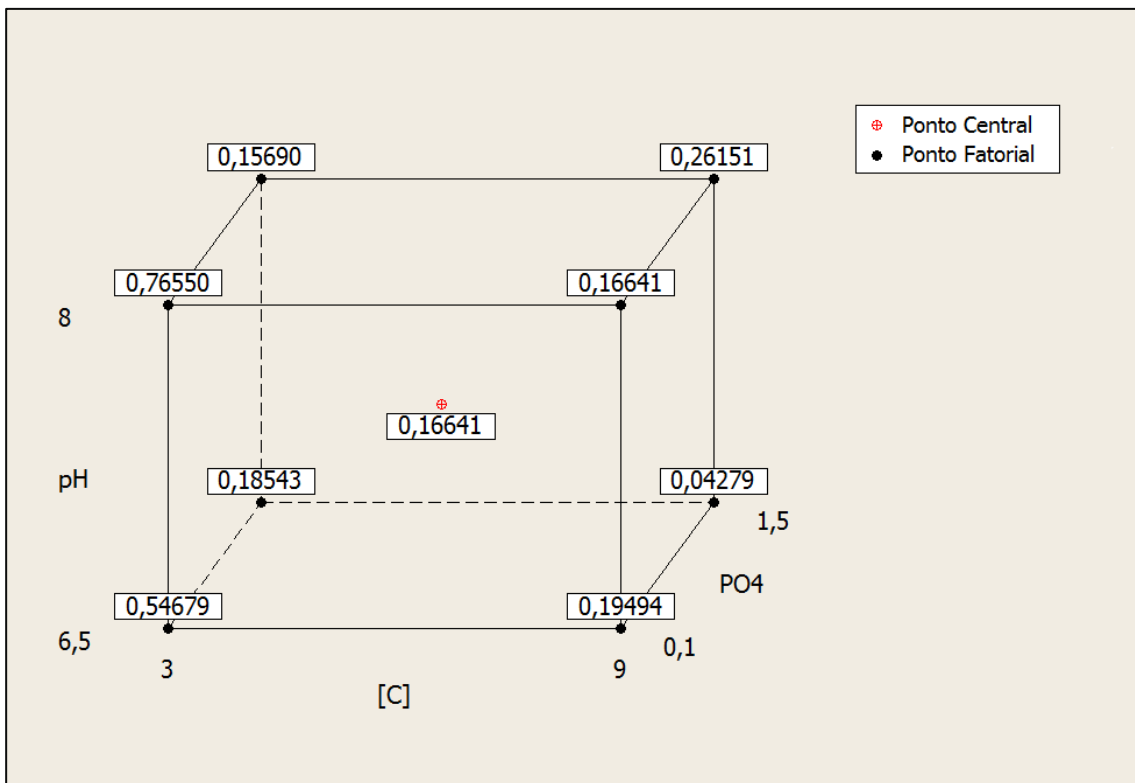


Figura 17 – Espaço de resposta para a atividade enzimática no fatorial completo de glicerol como fonte de carbono. (A) concentração de fosfato versus concentração da fonte de carbono; (B) pH versus concentração da fonte de carbono; (C) Concentração de fosfato de potássio versus pH.

concentração de fosfato (Figura 15). Os resultados experimentais médios para esse delineamento foram representados na Figura 17.

O resultado da melhora da atividade em função de um menor nível de fonte de carbono foi observado também para o experimento fatorial completo utilizando de óleo de oliva como fonte de carbono (Figura 14) contrapondo o indicado pelo fatorial de níveis mistos, pois, naquele delineamento, o modelo descrevia uma maior atividade enzimática em maiores concentrações da fonte de carbono (Figura 11).

Em otimização utilizando apenas fontes de carbono na produção de lipase de *Rhodotorula mucilaginosa* MTCC-8737, óleo de oliva apresentou os melhores resultados dentre as testadas (Chennupati, et al., 2009). Na otimização de *Geotrichum sp.* uma diferença de apenas 3,0U.mL<sup>-1</sup> foi encontrada entre a melhor fonte de carbono, óleo de soja, para a fonte óleo de oliva (Burkert et al, 2004). Possivelmente os resultados encontrados para *M. spathulatha* R25L270 poderiam ser replicados para outros óleos produzindo baixa mudança nos resultados. Também pode indicar a potencialidade dessa fonte na melhoria da produção de lipases por microrganismos.

Na otimização de cultivo de *Burkholderia multivorans*, percebeu-se que a fonte de carbono óleo de oliva foi significativo depois de uma triagem de variáveis iniciais para a concentração de 3% dessa variável. Para esse microrganismo, o fosfato foi a variável que exerceu o segundo maior efeito sobre a produção de lipases. (Gupta et al., 2007). Para otimização da produção da lipase de *Bacillus pumilus* RK31, óleo de oliva a 1% ao lado de tween 80 0,5% apresentaram os melhores resultados para explicar a variação na produção de lipase. A fonte fosfato teve o maior efeito dentre todas as variáveis para explicar a atividade lipásica em meio com óleo, mas não o pH, que foi excluído no delineamento preliminar de seleção (Kumar et al, 2011). Para *Candida sp.* notou-se que tanto óleo de soja quanto o fosfato apresentaram-se como fatores interferentes na produção de lipase (He, et al., 2006).

Por outro lado, de 12 fatores inicialmente triados para explicar a atividade lipásica, incluindo óleo de oliva, pH e fosfato, a fonte de carbono se mostrou significativa nessa associação em *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021 enquanto as demais (pH e fosfato) não se mostraram determinantes (Teng & Xu, 2008). Na otimização da produção da lipase de *Geobacillus thermoleovorans* CCR11, o óleo de açafrão bastardo e o pH não explicaram a produção de lipase para esse microrganismo e somente a temperatura e sopa nutriente de fontes de nitrogênio orgânicos exerceram a influência desejada (Sánchez-Otero et al., 2011). Em *Geobacillus sp.* ARM verificou-se a importância da fonte de carbono, extrato de



levedura e peptona para explicar a produção da enzima, além de íons sódio e cálcio (Ebrahimpour, et al., 2008).

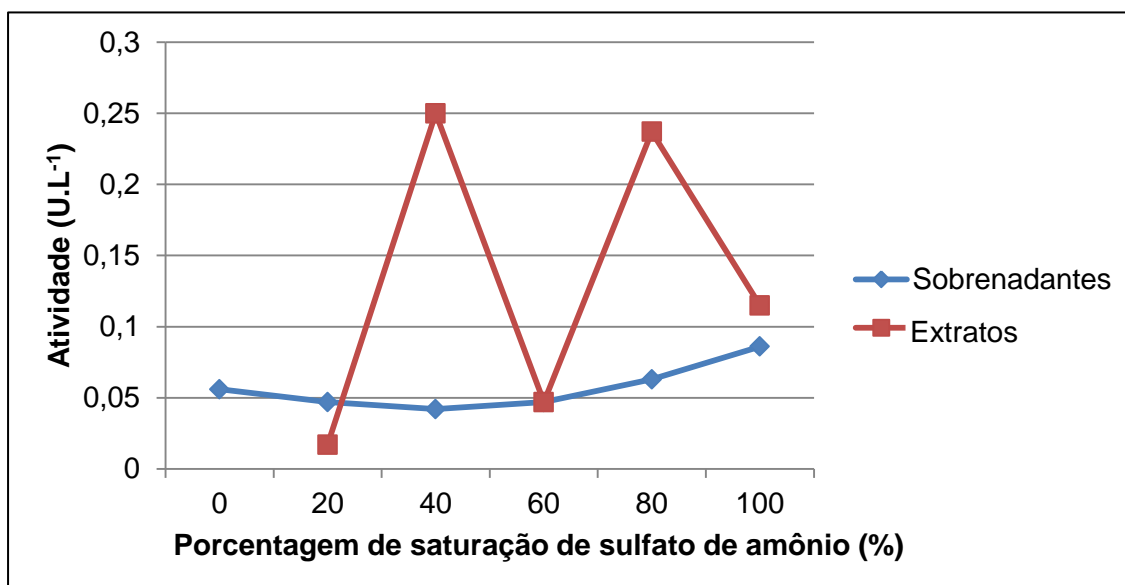
*Bacillus sp.* foi otimizado para produção de lipase frente a diferentes componentes cujo ótimo foi encontrado para glicerol 1%, fosfato 4%, dentre outros componentes, menos pH, que se mostrou não significativo (Gupta et al., 2004).

Nota-se que a regulação da produção de lipases é bastante singular para cada organismo, pela diferença de variáveis indutoras promovendo a produção em distintos microrganismos ainda que seja possível notar que algumas delas que tem maior ocorrência na produção de lipases como óleo de oliva (Burkert et al, 2004; Gupta et al., 2007; Chennupati, et al., 2009) e fosfato inorgânico (He, et al., 2006; Kumar et al, 2011).

## 12.4. Ensaio de padronização da purificação de lipase

### 12.4.1. Padronização da purificação parcial por sulfato de amônio

Nos ensaios de precipitação de enzimas lipásicas utilizando diferentes concentrações de sulfato de amônio (0 a 100 %) a partir do sobrenadante de cultivo de *Moniliella spathulata* com atividade detectável, percebeu-se que os extratos de 40 e 80% de saturação foram aqueles que produziam maior atividade lipásica quando reagem junto ao substrato sintético pNPP (Figura 18).



**Figura 18 – Atividade lipásica nos extratos obtidos em diferentes porcentagens de saturação de sulfato de amônio.** A atividade dos sobrenadantes está representada com linha azul e a dos extratos em vermelho.

Entretanto, na repetição da metodologia não apareceu precipitado para a fração de 40% depois da centrifugação a 14000g sob as mesmas condições executadas anteriormente. Dessa forma, pretendeu-se assegurar o isolamento da primeira fração apresentando atividade, antes recolhida em 40% de saturação utilizando uma faixa de concentração de  $\text{NH}_4\text{SO}_4$  que conteria a enzima de interesse.

Sendo assim, recolheram-se dois extratos de saturação: um primeiro de 0-60% de saturação e um segundo com 80% de saturação e padronizou-se essa metodologia de precipitação como base para as demais purificações.

Os resultados encontrados sugeriram a produção de duas diferentes lipases por *M. spathulata* R25L270, já que existiram dois diferentes extratos apresentando atividade lipásica aumentada, enquanto ela para o mesmo ponto no sobrenadante era muito mais reduzida (Figura 18).

Diversos estudos tem relatado o isolamento de isoenzimas da lipase por meio de precipitação com sulfato de amônio. Entretanto, na utilização dessa estratégia nos trabalhos na literatura, ou não se conseguiu o isolamento dessas duas isoenzimas nessa etapa ou não se desejou isso no estudo em questão. Para *Geotrichum sp.*, atividade lipásica foi observada nas frações correspondentes a saturação de 30 – 60% (Cai et al., 2009). Na precipitação de lipases de *Pseudomonas monteilii* TKU009, foram isoladas ambas as lipases conjuntamente para a condição de saturação de 30% (Wang et al., 2009). A precipitação empregou concentrações entre 60 – 75% de saturação no isolamento das lipases de *Thermosyntropha lipolytica* (Salameh & Wiegel, 2007). Utilizou-se um gradiente de 60 – 80% de saturação para precipitação das enzimas selvagens e recombinantes de *Rhizopus oligosporus var. microsporus*, resultando no isolamento das lipases em 60% (Iftikhar et al., 2011).

Este perfil de precipitação observado no ensaio pode ser resultante das diferenças das lipases produzidas por *M. spathulata*. Assim, elas podem ter se diferenciado na condição de saturação no isolamento das duas. A provável grande diferença superficial das enzimas de *M. spathulata* pode indicar uma distribuição de cargas em sua superfície, refletindo às suas solubilidades diferenciais. Sendo assim, cada proteína pode ter requerido uma concentração específica para remover sua camada de solvatação para ser precipitada. Possivelmente poderia haver diferenças na glicosilação entre essas enzimas ou distribuição de cargas na suas superfícies. Sabe-se que a solubilidade de uma proteína é em geral aumentada quando glicosilada (Lu et al., 2012; Solá & Griebenow, 2010).

#### **12.4.2. Ensaio de padronização das metodologias de separação pelo rastreamento de atividade das frações eluídas da enzima a partir de cultivo não otimizado**

##### **12.4.2.1. Estratégia inicial.**

Os extratos obtidos da precipitação com 60 ou 80 % de saturação de sulfato de amônio foram analisados por meio de cromatografia de gel filtração em coluna superose 12. Serão mostrados os cromatogramas de um sobrenadante de cultivo cuja atividade foi rastreada cujos resultados possibilitaram a montagem dos fluxogramas de purificação de lipase de *Moniliella spathulata* R25L270 (Figura 6 e **Erro! Autoreferência de indicador não válida.**).

##### **12.4.2.1.1. Cromatografia de exclusão molecular**

Utilizou-se da técnica de gel filtração inicialmente visto que ela tem sido amplamente utilizada para purificar lipases em 60% dos casos de separação de

lipases (Saxena et al., 2003, Saisubramanian et al., 2008). Percebeu-se que ambos os perfis cromatográficos vindos de diferentes extratos de saturação (60 e 80%) do sobrenadante de cultivo de *Moniliella spathulata* em coluna Superose 12 apresentavam picos contendo atividade nas primeiras frações de eluição (Figura 19 e Figura 20). Porém nessa última figura, aparecia também um pico de atividade nas frações 10 e 11.

Os primeiros picos eluídos a partir dos extratos de 60 e 80% de saturação (Figura 19 e Figura 20) sugeriram que a proteína dessas frações possuíam alta massa molecular devido essa metodologia cromatográfica eluir proteínas de maior peso molecular primeiramente. A coluna Superose 12<sup>®</sup> opera sob uma faixa de peso molecular variando desde 1 kDa até aproximadamente 200 kDa em cromatografia preparativa (SIGMA–ALDRICH). Porém proteínas glicosiladas possuem comportamento anômalo de eluição em coluna Superose 12<sup>®</sup>, pois podem não seguem um padrão de eluição proporcional ao seus pesos moleculares, ainda que o sistema cromatográfico esteja bem padronizado (Lee & Whitaker, 2004). Sendo assim, os resultados sugeriram uma faixa de tamanhos, mas não seriam eficientes para estimar pesos moleculares das proteínas eluídas.

Cogitou-se que a baixa resolução dos picos dos ombros 1-2 e 3-8 para ambas os extratos de saturação pode ter se explicado por existirem interações iônicas das proteínas eluídas com a matriz da coluna. Isso porque foi reportada melhor resolução cromatográfica para coluna Superose 12<sup>®</sup> quando a concentração de sais no tampão atingia níveis superiores a  $0,4\text{mol}^{-1}$  (Lee & Whitaker, 2004), provavelmente porque esses sais competiriam com as interações iônicas da proteína para com a coluna. Assim a concentração de sais no tampão não é considerada pelo fabricante como determinante para afetar a resolução cromatográfica (HEALTHCARE, 2006).

Foram percebidas diferenças nos perfis de eluição das frações de 60% e 80% após a cromatografia em Superose<sup>®</sup> 12, reforçando a hipótese de existirem duas lipases diferentes para *M. spathulata*. Os tempos de eluição dos picos com maior atividade na cromatografia do extrato de 60% surgiram nas frações eluídas 3–9 (Figura 19). Na cromatografia do extrato de 80% essas surgiram picos de atividade nas frações 2–8 e 10-11 (Figura 20).

Analisando a similaridade entre as metodologias dos diferentes extratos inicialmente pelo perfil das proteínas eluídas, notou-se que para ambos os processos de separação, a fração com maior quantidade de proteínas foi a de

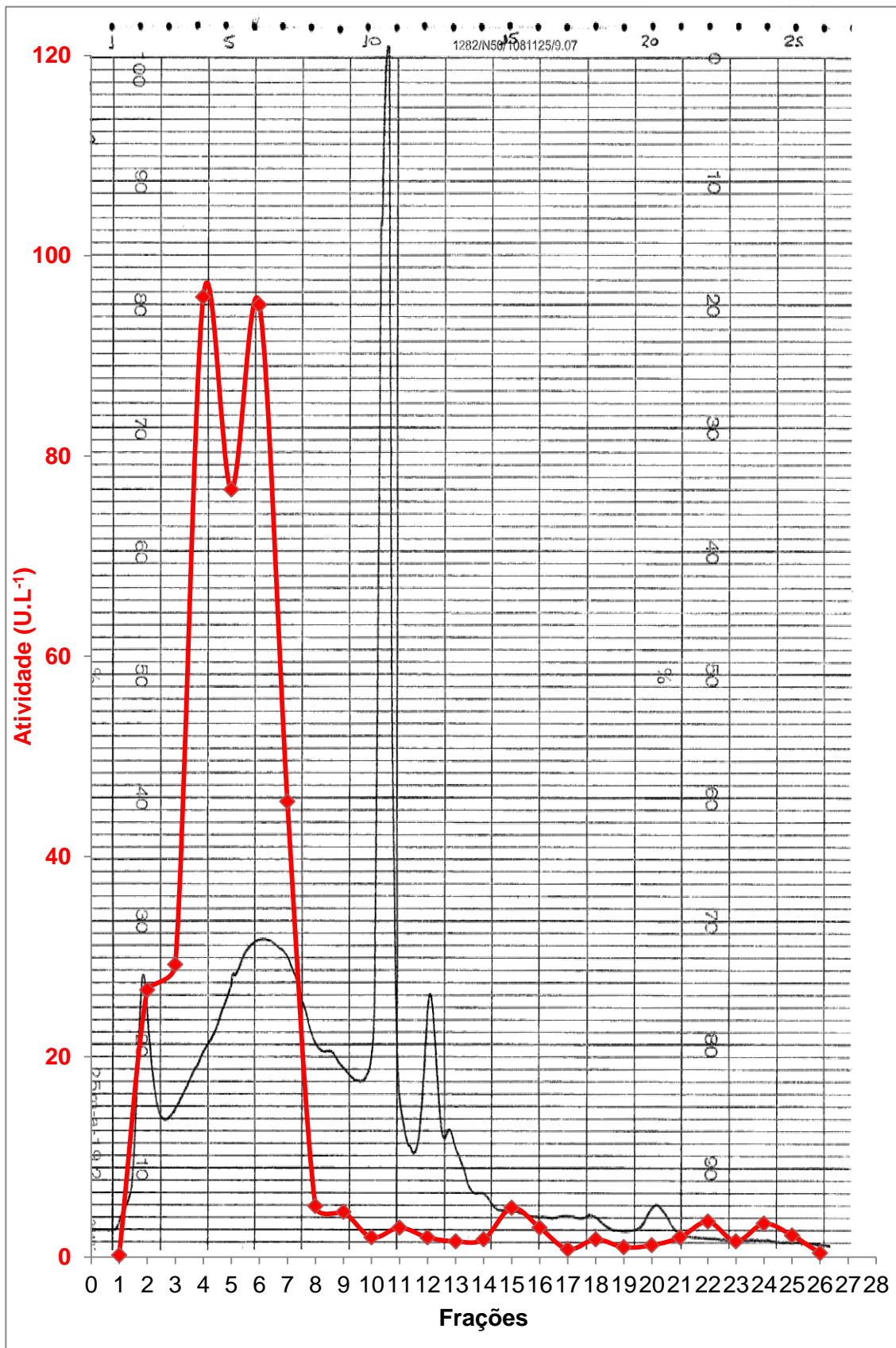


Figura 19 – Perfil cromatográfico exploratório de Gel Filtração em coluna Superose® 12 HR 10/30 do extrato em 60 % de saturação. Tampão Tris-HCl 0,02mol.L<sup>-1</sup> pH = 8,0. Fluxo 30mL/h, temperatura 25°C. A linha em preto corresponde à absorção a 280 nm.

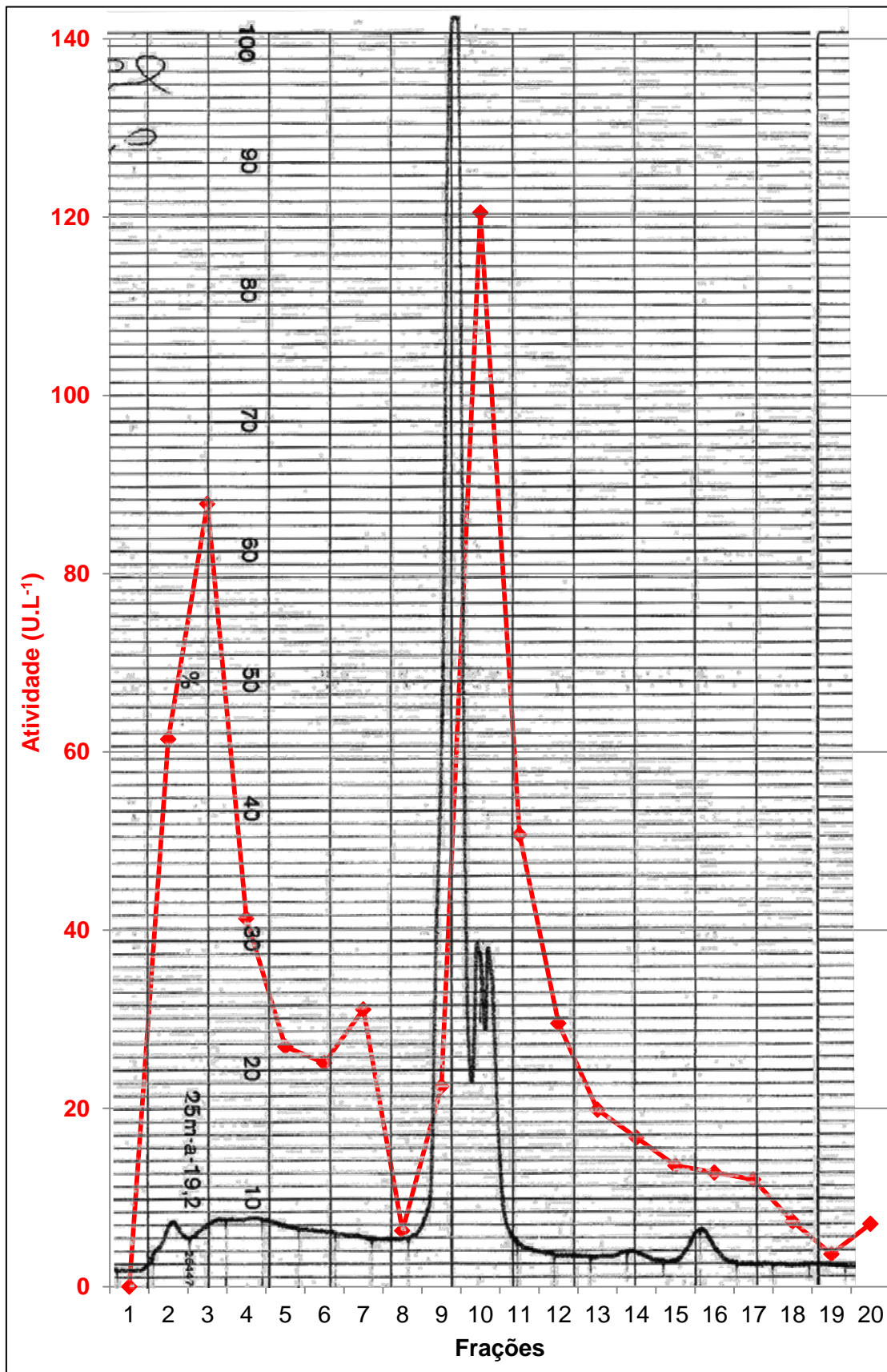


Figura 20 - Perfil cromatográfico exploratório de Gel Filtração em coluna Superose® 12 HR 10/30 do extrato em 80 % de saturação. Tampão Tris-HCl 0,02mol.L<sup>-1</sup> pH = 8,0. Fluxo 30mL/h temperatura 25°C. A linha em preto corresponde à absorção a 280 nm.

número 10-11 (Figura 19 e Figura 20). Existiu também um pico inicial consensual eluído na fração 2 e 3 nas duas condições. Percebeu-se também que as frações de número 2 e 3 apresentaram atividade para ambos os extratos (Figura 19 e Figura 20).

As diferenças nos perfis de eluição foram os seguintes. Um pico entre as frações 3–9 não apareceu tão pronunciado na cromatografia do extrato de 80% (Figura 20) quanto no de 60% (Figura 19). Percebeu-se que uma grande atividade relativa foi detectada no ombro recolhido entre as frações 3–9 na eluição da fração de 60% (Figura 19) que não aparece tão pronunciado na cromatografia da fração de 80% (Figura 20) por sua vez. Além disso o pico da fração 11 com maior quantidade de proteínas eluídas para a fração de 60% (Figura 19) não apresentou atividade frente ao substrato sintético, assim como foi observado na cromatografia da fração de 80% (Figura 20), cujo frasco de mesmo número apresentou a maior atividade enzimática .

Todas as diferenças entre as cromatografias dos extratos de 60% e 80% eluídos através dos dois perfis cromatográficos apontaram novamente para a existência de mais de uma lipase produzida por *Moniliella spathulata* R25L270. Uma primeira forma com alto peso molecular recolhidas nas frações consensuais 2 e 3 das cromatografias dos extratos de 60% (Figura 19) e 80% (Figura 20) de saturação de sulfato de amônio. A segunda forma exclusiva das frações ativas de número 3–9 da cromatografia com o extrato de 60% de saturação (Figura 22). Uma terceira possível lipase presente nas frações de número 10-11 da cromatografia do extrato de 80% de saturação de sulfato de amônio (Figura 20).

Cabe ressaltar que as frações número 2 e 3 dos dois processos cromatográficos poderiam ainda ser duas lipases distintas visto que elas vieram de duas frações de saturação diferentes (Figura 19 e Figura 20). Além disso, as frações eluídas a partir do extrato de 80% de saturação constituíram o ombro de números 3 a 7 (Figura 20) apresentou dois picos de atividade com um pequeno vale de atividade entre eles, tudo isso em uma região em que as proteínas não estão bem resolvidas entre si. Isso pode ser um indicativo de existir duas lipases para aquela região também.

Em geral as lipases de microrganismos que possuem duas isoformas dessa enzima possuem valores distintos de peso molecular, o que resulta em perfil cromatográfico diferente empregando a técnica de gel filtração. Para as lipases de *Geotrichum* sp SYBC WU–3, houve diferença de 5,3 kDa entre as lipases A (41,1 kDa) e B (35,8 kDa) (Cai et al., 2009). As lipases A e B de *Thermosyntropha lipolytica* diferiam em apenas 7 kDa entre si 50 kDa (lipA) e 57 kDa (lipB) (Salameh & Wiegel, 2007). Similarmente, as lipases A e B de *Candida cylindracea* diferiram em suas



massas em apenas 2 kDa, 64 kDa (lipA) e 62 kDa (lipB) (Rúa et al., 1992). As quatro lipases de *Geotrichum candidum* ATCC 34614 (I e II) e CMICC 335426 (a e b) estavam glicosiladas. Suas massas eram de 62, 62, 62 e 58,3 kDa, respectivamente. A glicosilação de suas moléculas conferia um aumento médio de 7,86% na sua estimativa de massa (Sidebottom et al., 1991). Por outro lado, a purificação das lipases de *Pseudomonas monteilli* TKU009, proporcionou o recolhimento de uma fração insolúvel (lipA), incapaz de ter seu peso estimado, e outra solúvel com 40 kDa (lipB) (Wang et al., 2009).

A partir dos dados da literatura percebeu-se que, em geral, as lipases diferem de peso molecular entre si muito pouco quando são produzidas pelo mesmo microrganismo. O fato de terem sido isoladas frações com atividade lipásica em picos eluídos em tempos bastantes distintos é um indício de que podem existir lipases com diferenças significativas de peso molecular (Figura 19 e Figura 20). Sobretudo quando se analisam os picos de maior atividade entre as cromatografias dos extratos de 60 e 80%.

#### **12.4.2.1.2.Cromatografia de fase reversa**

A cromatografia de fase reversa foi feita com as frações ativas concentradas do frações da filtração molecular. Primeiramente tomou-se as frações 2 e 3 concentradas e aplicou-as no sistema de separação (Figura 21). Muito embora várias frações tivessem sido retidas na coluna, elas não apresentavam atividade lipásica. Afinal, mesmo utilizando a solução das frações diretamente na reação de atividade sem diluí-las, foram necessárias três horas de reação com o substrato sintético pNPP para uma leitura em espectrofotômetro ser possível. Ainda assim, não existiu satisfatória correlação entre os dados obtidos na cinética nas frações com o perfil cromatográfico, indicando que para a leitura feita nas frações poderia ter ocorrido a degradação (hidrólise) do reagente e não a reação catalisada por enzima.

Na cromatografia das frações 10 e 11 (Figura 22), ainda que na fração eluída percebeu-se uma atividade muitíssimo diminuída, ela se correlacionou bem com o perfil de proteínas nessas frações. Além disso, embora o pico de atividade não estivesse relacionado com a fração que estava interagindo com a coluna (frações 4–11), a técnica conseguia isolar a fração da proteína com atividade das outras frações demais presentes no concentrado (frações 18–29) obtido na cromatografia de gel filtração.

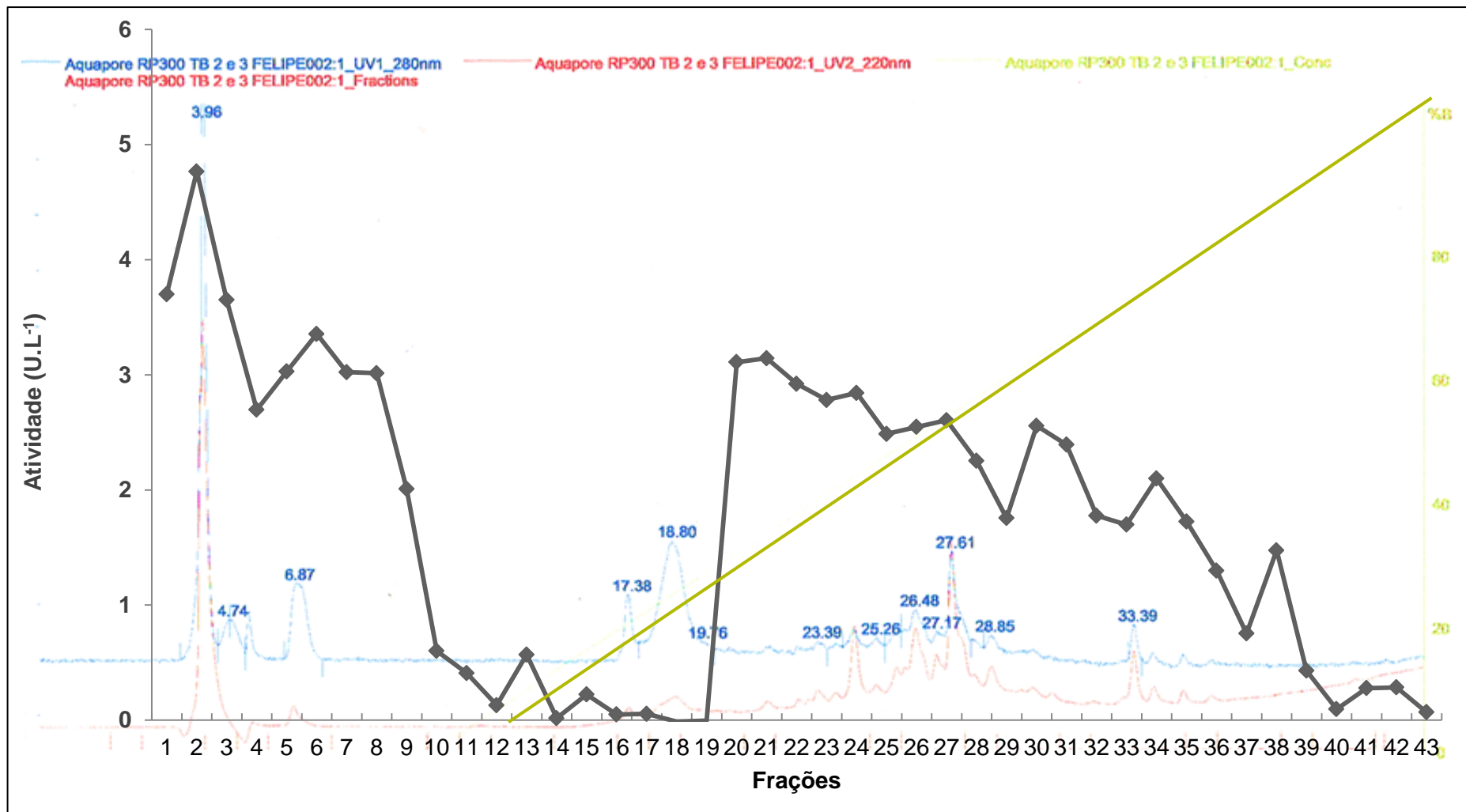


Analisando novamente o cromatograma da Figura 22, cujas frações produzidas na técnica apresentaram atividade somente nas alíquotas iniciais que foram eluídas apenas com a fase A, cogitou-se a possibilidade de moléculas orgânicas presentes no eluente estarem interferindo na atividade da enzima. Possivelmente a acetonitrila (ACN) pudesse apresentar um efeito mais danoso para a atividade da enzima em relação ao ácido trifluoroacético (TFA), refletindo na sua inativação quando a ACN estivesse presente no eluente. Para o pool das frações 2 e 3 eluídos, os efeitos de TFA e ACN foram igualmente e criticamente importantes para inibir a atividade da enzima.

Além disso, é possível que a razão da lipase não ter sido ligada à coluna de fase reversa para a fração 10 e 11 poderia ser devido que ela estivesse muito glicosilada, pois em geral a glicosilação interfere aumentando o grau de hidrofiliidade das proteínas, também aumentando sua carga líquida negativa e o raio hidrodinâmico das mesmas (Varki et al., 2009). Lipases de *Thermomyces lanuginosus* diferencialmente glicosiladas não tiveram sua capacidade de interagir com superfícies hidrofóbicas mudada, em contrapartida, foi distinta a interação com superfícies hidrofílicas dependendo do tipo de glicosilação (Pinholt et al., 2010). A lipase do mesmo microrganismo quando não glicosilada se associava com maior afinidade a superfície apolar C18 em comparação com uma superfície hidrofílica (Sonesson et al., 2008).

Como o processo cromatográfico por fase reversa envolve a interação simultânea de fases polares e apolares, o comportamento interativo da lipase será dado pela energia livre de interação global: a soma da energia livre das interações hidrofílicas e hidrofóbicas envolvidas (Queiroz et al., 2001). Se as lipases tem suas interações com superfícies hidrofílicas favorecidas essas enzimas poderiam responder similarmente em meios líquidos devido à natureza das interações nesse novo meio poder ser a mesma. Ou seja, quando a proteína estivesse no sistema cromatográfico de fase reversa, ela interagiria fracamente com a fase fixa, adsorvendo-se preferencialmente com a fase móvel demonstrou glicosilação, sendo eluída mais rapidamente.

Algumas lipases tem se comportado de maneira bem distinta em sistemas de fase reversa. Em geral elas se ligam às colunas e são eluídas com valores diferentes de gradiente. A lipase de *R. oryzae* foi eluída em 12% de acetonitrila. A enzima análoga de *Mucor hiemalis f. hiemalis* foi eluída em 9% de acetonitrila, mas para a enzima *Penicillium cyclopium* o gradiente teve de atingir 55% (Hiol et al., 2000).



**Figura 21 - Cromatografia de fase reversa do pool das frações 2 e 3 advindas da cromatografia de Gel Filtração em coluna Aquapore RP300 (Perkin Elmer®).** A: Ácido Trifluoracético 0,05 %; B: TFA 0,05 % em Acetonitrila; fluxo 60mL/h. Gradiente 0-100 % B em 10 - 40 min; temperatura 25 °C. A linha preta representa a atividade a 410 nm.

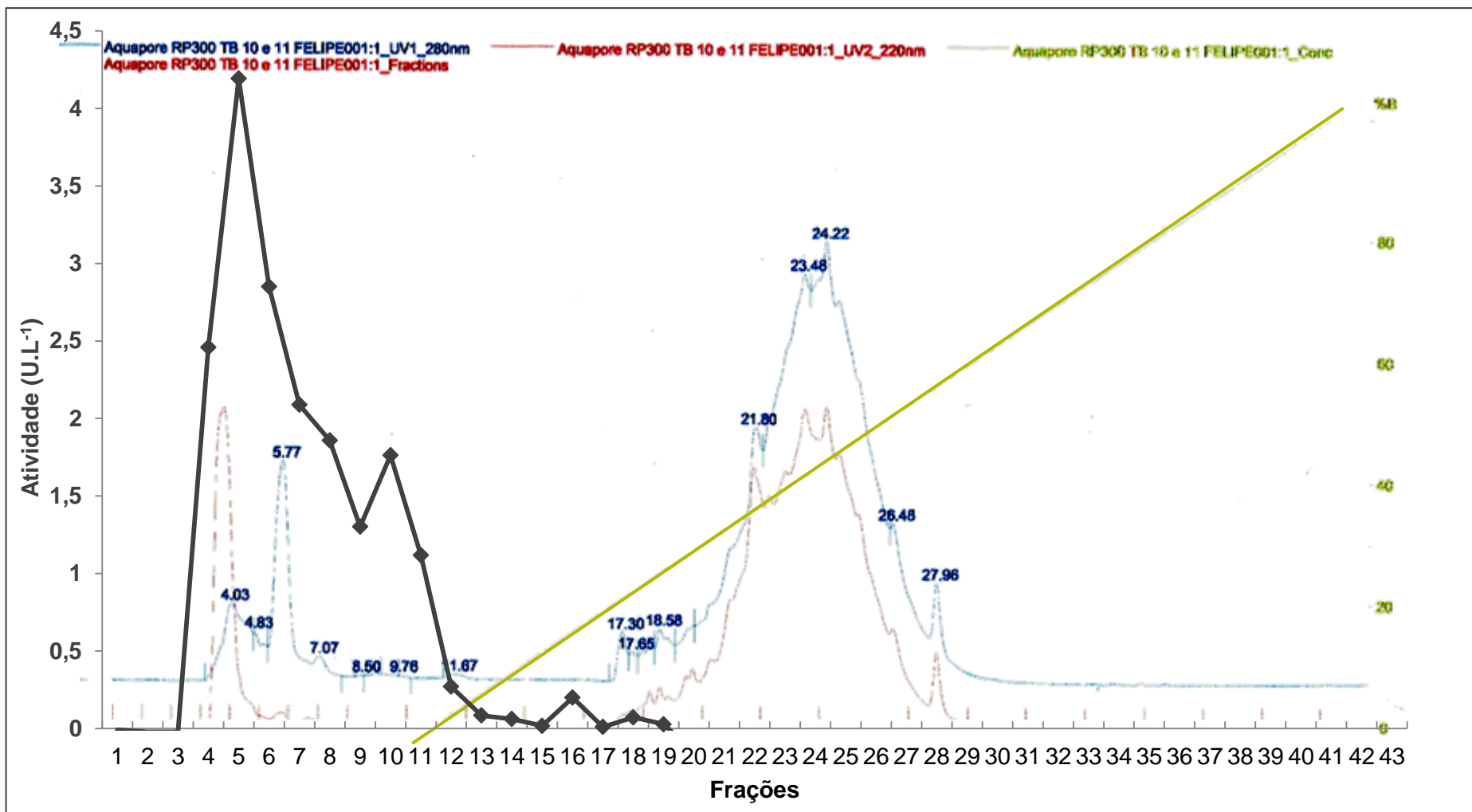
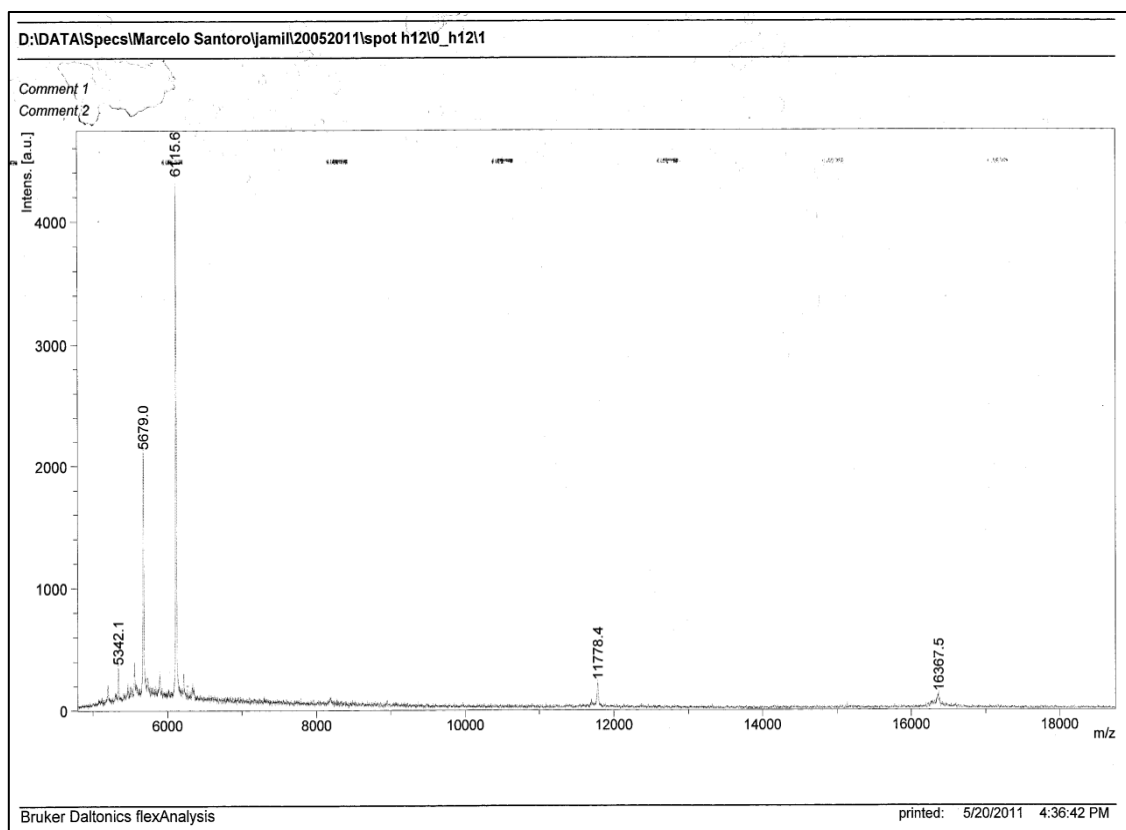


Figura 22 - Cromatografia de fase reversa do pool das frações 10 e 11 advindas da cromatografia de Gel Filtração em coluna Aquapore RP300 (Perkin Elmer®). A: Ácido Trifluoracético 0,05 %; B: TFA 0,05 % em Acetonitrila; fluxo 60mL/h. Gradiente 0-100 % B em 10 - 40 min; temperatura 25 °C. A linha preta representa a atividade a 410 nm.

Decidiu-se por fazer a espectrometria de massas dos picos com atividade recolhidos na fração 4 a 6 da cromatografia de fase reversa da Figura 22, porém somente a fração 6 produziu íons detectáveis. A maior razão massa/carga possuía baixa intensidade. Mesmo assim, seu valor revelava uma massa muito inferior (16.357,5Da) à uma faixa média esperada para uma lipase de 30 a 60 kDa (Figura 23).

Esse resultado novamente foi mais um indício de que as frações testadas possuem conteúdo elevado de glicosilação. Isso porque a matriz mais adequada para ionizar proteínas glicosiladas é aquela contendo o ácido 2,5 dihidroxibenzoico (DHB) (Mank et al., 2004, Hedrich et al., 1993).



**Figura 23 - Espectro de massas da amostra 6 obtida pela cromatografia de fase reversa do extrato concentrado do pool das frações 10 e 11 isoladas por exclusão molecular do extrato de 80 % do sobrenadante de cultivo. Matriz de ácido sinapínico. Calibração com Protein Calibration Standard II for Mass Spectrometry**

#### 12.4.2.1.3. Cromatografia de troca iônica

A cromatografia de troca iônica foi usada para a separação da lipase de *M. spathulata* R25L270 visto que a maioria dos trabalhos utiliza tanto técnicas de troca aniônica quanto catiônica para isolamento da enzima microbiana (Saxena, et al, 2003). Algumas frações eluídas da gel filtração que poderiam apresentar carga em sua superfície e serem separadas devido a essa característica. As cromatografias

seguintes possibilitariam tanto para prever a carga líquida das enzimas quando para promover a separação das mesmas.

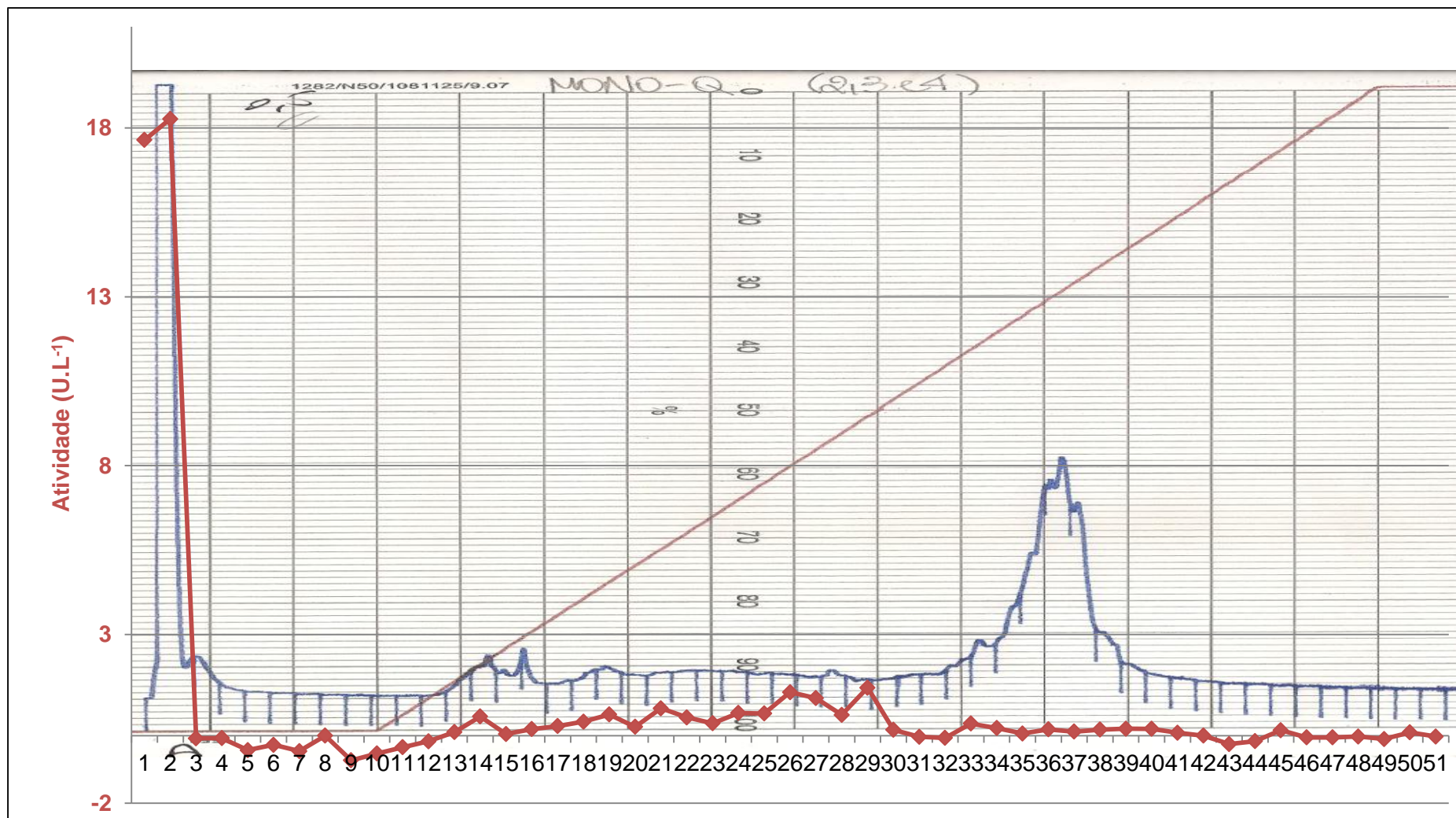
#### **12.4.2.1.3.1. Cromatografia de troca aniônica**

Foi recolhido extrato de 80% de saturação de sulfato de amônio e depois concentradas as frações ativas remanescentes na cromatografia de filtração molecular para as amostras serem cromatografadas em troca aniônica. Primeiramente as frações ativas 2, 3 e 4 da gel filtração (Figura 19) foram agrupadas para produzir um extrato que foi injetado na coluna de troca aniônica. Percebe-se pelo perfil de eluição dessas frações uma má interação delas para com a fase fixa coluna (Figura 24), já que toda a fração ativa foi eluída, sugerindo fraca carga líquida positiva nela para interação com a fase fixa em pH 8,0.

Contudo as frações entre 32 e 40 (Figura 24) apresentaram proteínas com satisfatória interação com a coluna e, para a eluição delas, foi necessário um gradiente de 58 a 80% de fase B. Porém essas frações eluídas apresentaram baixa resolução, formando um ombro que não apresentou nenhuma atividade lipásica satisfatória, tanto para a cromatografia do pool de frações 2, 3 e 4 quanto para as frações 10 e 11 (Figura 25).

Os resultados sugeriram que outras proteínas estariam possivelmente agregadas às lipases, pois as cromatografias de troca iônica até então possuem certa similaridade, apresentando um pico inicial com praticamente toda a proteína injetada no sistema, mesmo quando as frações de origem eram distintas (Figuras 27 e 28). Provavelmente devido à agregação das proteínas, as cargas disponíveis para a interação com a coluna tenham sido poucas, pois as suas partes polares negativas glicosiladas poderiam estar interagindo intensamente entre si e exporiam mais suas porções apolares, embora a proteína estivesse solúvel. Assim as enzimas agregadas estariam pouco interativas com a fase fixa da coluna devido a possível carência de grupos carregados expostos. Essa hipótese estaria apoiada no fato de que a resolução das cromatografias de fase reversa (Figuras 24 e 25) foram bem mais elevadas do que na cromatografia de troca iônica.

Cogitou-se, também, que as proteínas eluídas no sistema de troca iônica poderiam também estar agregadas através da sua forte interação de suas partes polares e glicosiladas. Como a proteína estava solúvel, os grupos expostos da lipase e das outras possíveis proteínas agregadas poderiam apresentar uma carga líquida positiva também, inibindo a interação com a coluna.



**Figura 24 - Cromatografia de Troca Aniônica do pool das frações 2, 3 e 4 com atividade lipásica vindas da cromatografia de gel filtração do extrato de 80% de saturação.** Coluna mono-Q, A: Tris HCl 0,05mol.L<sup>-1</sup> pH 8,0; B: Tris HCl 0,05mol.L<sup>-1</sup> com NaCl 1,0 mol.L<sup>-1</sup>, pH 8,0. fluxo 60mL/h. temperatura 25 °C. A absorbância a  $\lambda_{415}$  das fracões corresponde à linha em vermelho. Em azul a absorbância a 280nm.



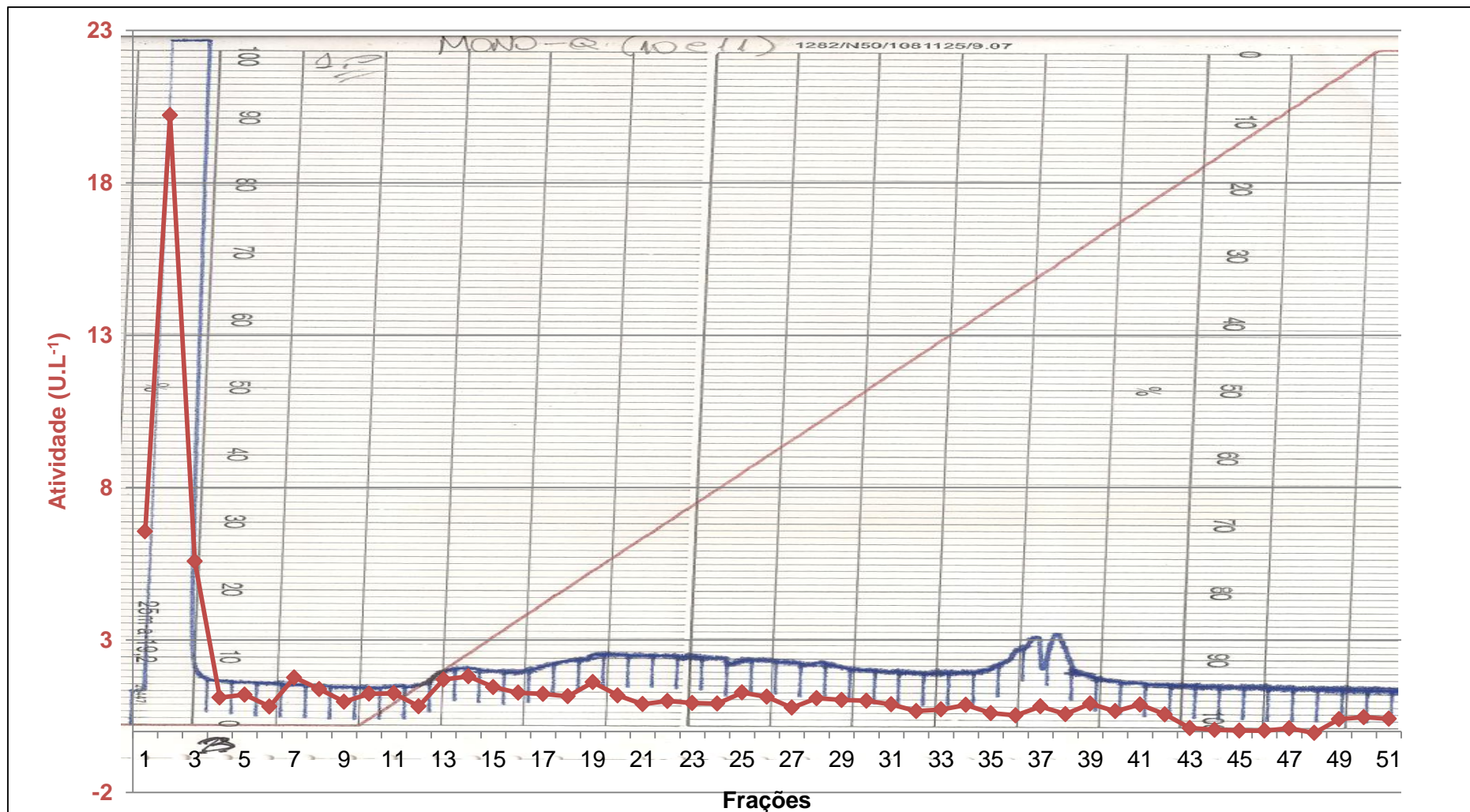


Figura 25 – Cromatografia de Troca Aniônica do pool das frações 10 e 11 com atividade lipásica vindas da cromatografia de gel filtração do extrato de 80% de saturação. Coluna mono-Q A: Tris HCl 0,05mol.L<sup>-1</sup> pH 8,0; B: Tris HCl 0,05mol.L<sup>-1</sup> com NaCl 1,0mol.L<sup>-1</sup> pH 8,0, fluxo 60mL/h, temperatura 25 °C. A absorbância a  $\lambda_{410}$  das frações corresponde à linha em vermelho. Em azul a absorbância a 280nm.

Analisando a purificação no sistema de troca aniônica sob a ótica inversa, ou seja, a ligação de proteínas indesejadas no sistema de purificação e a eluição das proteínas desejadas, existiria da mesma forma a purificação. Porém percebeu-se pelos cromatogramas que a quantidade de proteína retida na coluna variou significativamente para as os dois pools de atividade eluídos 2, 3 e 4 ou 10 e 11 (Figuras 27 e 28). A resolução da técnica se mostrou baixa visto que quase nenhuma ou poucas frações protéicas interagiram com a coluna, gerando um pico que pode conter muitas impurezas. Sendo assim, uma nova metodologia de purificação para ser testada se fazia necessária e executou-se a troca catiônica.

#### **12.4.2.1.3.2. Cromatografia de troca catiônica**

Foi feito um teste com o pool de frações ativas (3 a 7) advindo da cromatografia de gel filtração do extrato de 60% de saturação (Figura 19). Percebeu-se um perfil de eluição distinto das cromatografias em troca aniônica, sobretudo porque foram isoladas duas frações distintas com atividade enzimática por essa técnica (Figura 26).

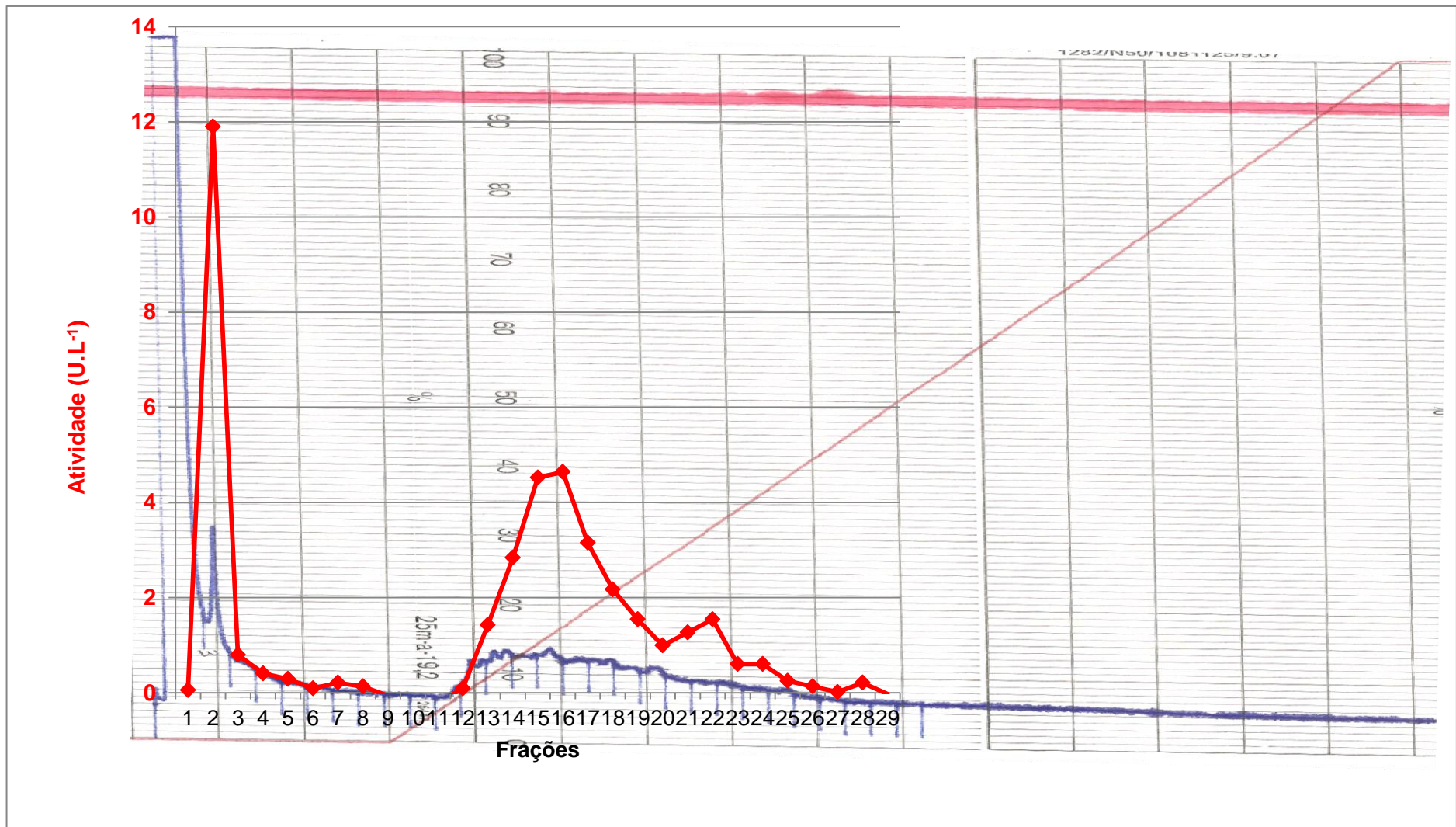
Se observou um pico inicial eluído apenas com a fase A, seguido da eluição de um pico com atividade enzimática no início do gradiente (Figura 26). A partir desses dados, pode-se supor que exista um agregado inicial proteico contendo uma lipase ativa que não exibe carga líquida suficiente para interagir com a coluna (frações 1-3) e uma segunda fração com lipase contendo carga positiva que interage com a coluna (frações 13-19). Essas frações poderiam também estar agregadas com outras proteínas, culminando com uma fraca interação delas com a coluna, visto que a resolução do pico de atividade ficou comprometida (Figura 26).

A ligação parcial da enzima com atividade na coluna em um sistema cromatográfico de troca catiônica reforça as suposições sobre a natureza superficial positiva da enzima. Mas também reforça a suposição de que a enzima possuía um número reduzido de cargas em sua superfície, pois foi necessário um gradiente sutil (5 – 20%) da fase B para provocar sua desorção da coluna cromatográfica.

#### **12.4.3. Purificação da lipase pela estratégia 2 e identificação da influência das fontes de carbono no meio de cultivo sobre padrão de produção de lipases por *M. spathulata* R25L270.**

Os resultados mostrados foram os gerados a partir da purificação da lipase utilizando os passos anteriormente testados que produziram os melhores resultados: cromatografia de gel filtração seguida de cromatografia de troca iônica, mas





**Figura 26 - Cromatografia de Troca catiônica das frações 3 a 7 vindas de cromatografia de gel filtração. Coluna Mono S. A: acetato de sódio 0,05mol.L<sup>-1</sup>; B: acetato de sódio 0,05 mol.L<sup>-1</sup> com 1,0 mol.L<sup>-1</sup> NaCl, pH 4,0 fluxo 60mL/h, temperatura 25 °C.**

também a etapa adicional de afinidade deveria ainda ser testada.

Também foi feita essa purificação a partir de dois sobrenadantes de cultivo distintos. Um utilizando de fonte de carbono óleo de oliva e outro empregando glicerol (item 2.3). Nessa estratégia a etapa de precipitação por sulfato de amônio gerou resultados similares aos já reportados e os dados não foram mostrados.

#### **12.4.3.1. Cromatografias de gel filtração e identificação da influência fontes de carbono no meio de cultivo sobre padrão de produção de lipases por *M. spathulata* R25L270.**

Na repetição da metodologia de gel filtração, quando se recolheu e purificou os sobrenadantes de cultivo da cultura de *M. spathulata* R25L270 crescido em meio contendo ou glicerol ou óleo de oliva, observou-se distinção no comportamento das frações eluídas para cada fração de saturação. Notou-se que o perfil de eluição das proteínas seguia a mesma tendência geral para todas as cromatografias como foi observado nas Figura 19 e Figura 20, independentemente da fonte de carbono ou extrato com fração de saturação (Figura 27, Figura 28, Figura 29 e Figura 30).

O primeiro cultivo fora feito utilizando-se de óleo de oliva como fonte de carbono (Figura 19 e Figura 20). Comparando as duas cromatografias feitas sob a mesma condição – extrato de 60% de saturação de sulfato de amônio de um cultivo de óleo de oliva - (Figura 19 e Figura 28), se percebeu uma satisfatória reprodutibilidade da técnica em termos qualitativos, pois os picos de atividade foram eluídos nas frações iniciais juntos a um ombro inicial nas duas técnicas.

Comparando a cromatografia da fração de 80% da primeira padronização com a segunda tentativa notou-se também similaridade na repetição da técnica (Figura 20 e Figura 30). Entretanto o pico que apresentou maior atividade na primeira cromatografia foi aquele com frações recolhidas próximas as de número 10 e 11 (Figura 20). Nessa nova tentativa, percebeu-se que o pico recolhido no pool de frações de números 3 a 7 foi mais ativo do que as frações recolhidas nos picos 10 e 11 (Figura 20).

Porém foi percebido que na cromatografia da repetição do método da fração de saturação de 60% (Figura 28), ocorreu uma diminuição da resolução da coluna devido o contorno dos picos das frações recolhidas, sobretudo para a região das frações ativas 2-4 não apresentarem picos bem definidos. A cromatografia do extrato de 80% do meio de cultura contendo óleo de oliva como fonte de carbono (Figura 30) também apresentou menor resolução comparando com a primeira tentativa (Figura 20).

As principais mudanças foram o desaparecimento do pico na fração 2 da segunda tentativa, o aumento da intensidade do ombro de números 3 a 7 e o desaparecimento dos picos da fração 11 (Figura 30). Isso sugeriu que a proteína poderia estar efetivamente se ligando de forma irreversível à coluna devido à carência de sal no tampão de eluição, bloqueando os sítios de interação na fase fixa e prejudicando assim sua capacidade de resolução.

Também puderam ser observadas interessantes diferenças do perfil de produção de uma mesma fração de saturação quando ela adviesse ou de glicerol ou de óleo de oliva. Notou-se um aparente aumento relativo de produção da lipase recolhida nas frações 10 e 11 para as frações advindas do cultivo com glicerol em comparação com óleo de oliva em ambos os extratos de saturação (Figura 27 e Figura 29). Notou-se que os cultivos em fonte de carbono óleo de oliva, para os dois extratos de saturação, possibilitaram o recolhimento das frações mais ativas junto a um ombro das frações 2 a 7 (Figura 28 e Figura 30).

Essa tendência em particular pode refletir o efeito que a fonte de carbono exerce na produção da lipase. Supos-se existir diferentes promotores de lipase induzidos por óleo de oliva ou glicerol no microrganismo de forma que, quando essas fontes de carbono estivessem presentes ou ausentes, seria variada a intensidade dos transcritos que originariam as lipases, repercutindo no diferencial perfil cromatográfico das amostras purificadas.

#### **12.4.3.2. Cromatografias de troca aniônica**

Segundo o fluxograma de trabalho (Anexo 1), submeteram-se as amostras purificadas em gel filtração para uma nova técnica já previamente testada na tentativa de isolamento das possíveis diferentes lipases produzidas. As frações purificadas na cromatografia de gel filtração, foram separadas nas suas frações 2 e 3, constituindo o primeiro pool de atividade; as frações 4, 5 e 6, constituindo o segundo pool de atividade e o terceiro foi constituído pelas frações agrupadas 10 e 11. Como haviam 2 frações ativas obtidas na precipitação que poderiam vir de cultivo com duas fontes de carbono distintas, foram feitas  $2 \times 2 \times 3 = 12$  corridas em troca iônica.

Foi possível recolher frações ativas derivadas da técnica de gel filtração como aquelas obtidas em 60% de saturação de sulfato de amônio e um segundo grupo obtido em 80%. Observou-se inicialmente que todos os pools obtidos através da precipitação em 80% de saturação perderam praticamente

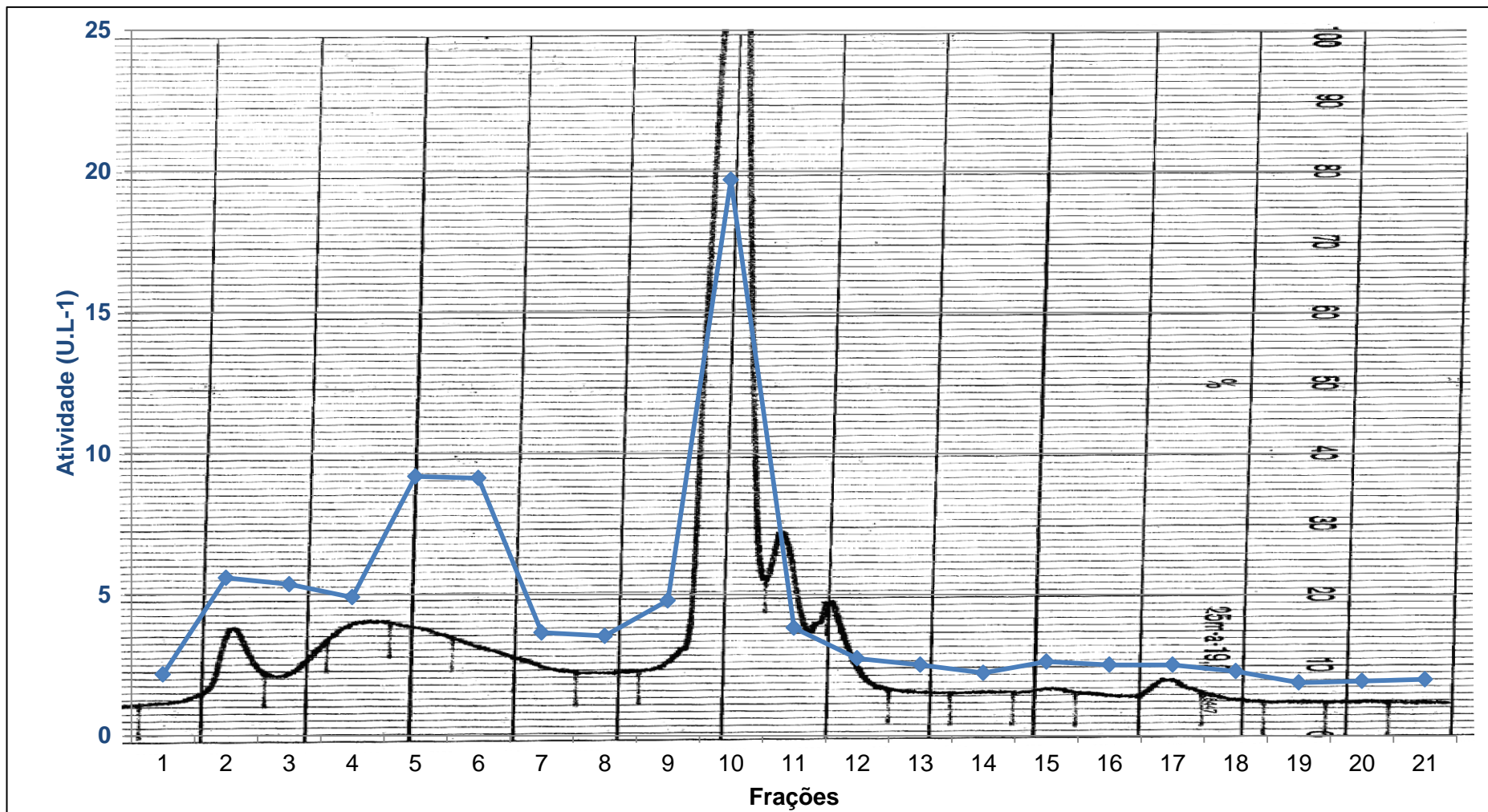


Figura 27 - Perfil da cromatografia de Gel Filtração em coluna Superose® 12 HR 10/30 com extrato em 60% de saturação do cultivo com fonte de carbono glicerol. Tampão Tris-HCl 0,02 mol.L<sup>-1</sup> pH = 8,0. Fluxo 30mL/h, temperatura 25°C. A linha em preto corresponde à absorção a 280 nm.



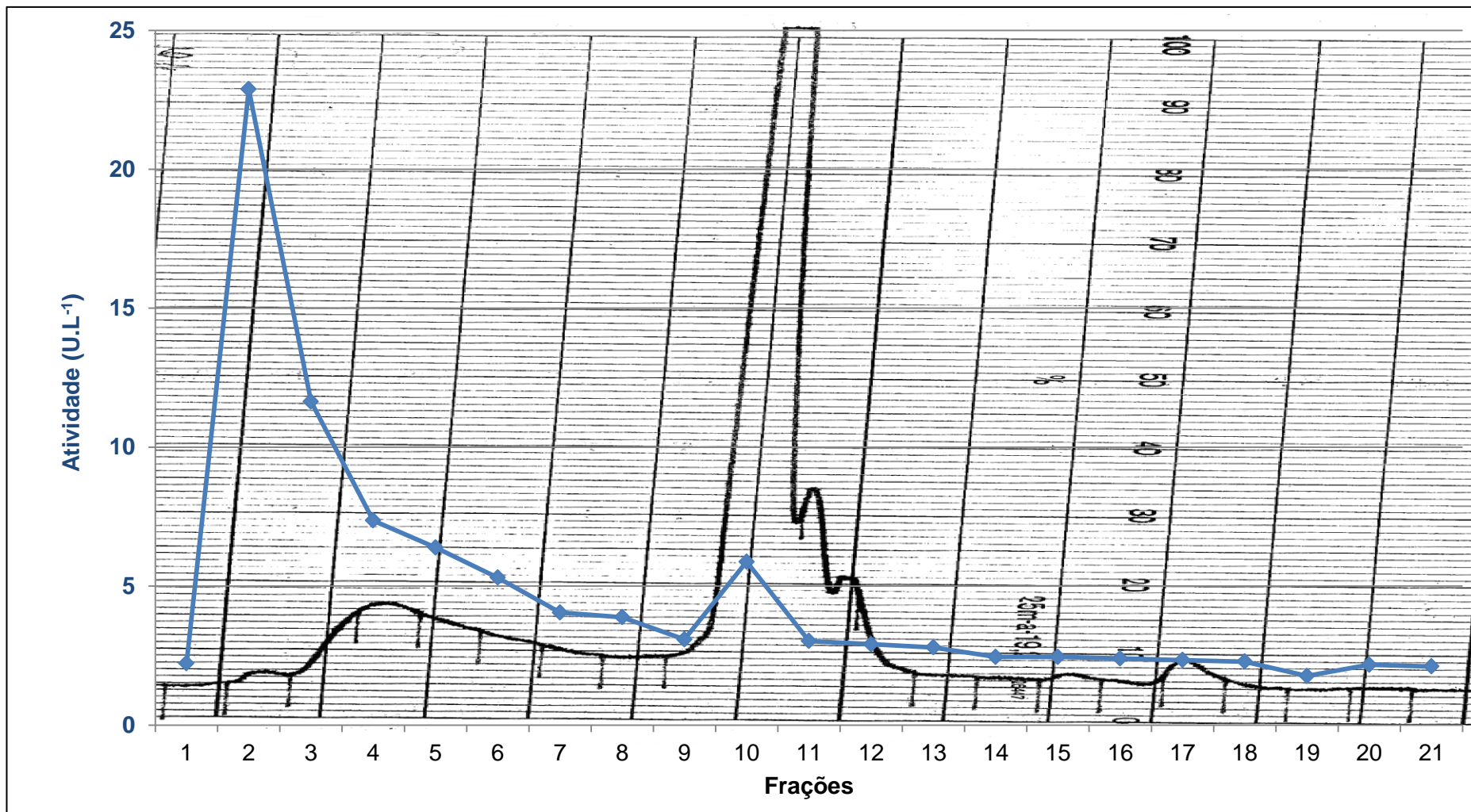


Figura 28 - Perfil da cromatografia de Gel Filtração em coluna Superose® 12 HR 10/30 com extrato em 60% de saturação do cultivo com fonte de carbono óleo de oliva. Tampão Tris-HCl 0,02 mol.L<sup>-1</sup> pH = 8,0. Fluxo 30mL/h, temperatura 25°C. A linha em preto corresponde à absorção a 280 nm.

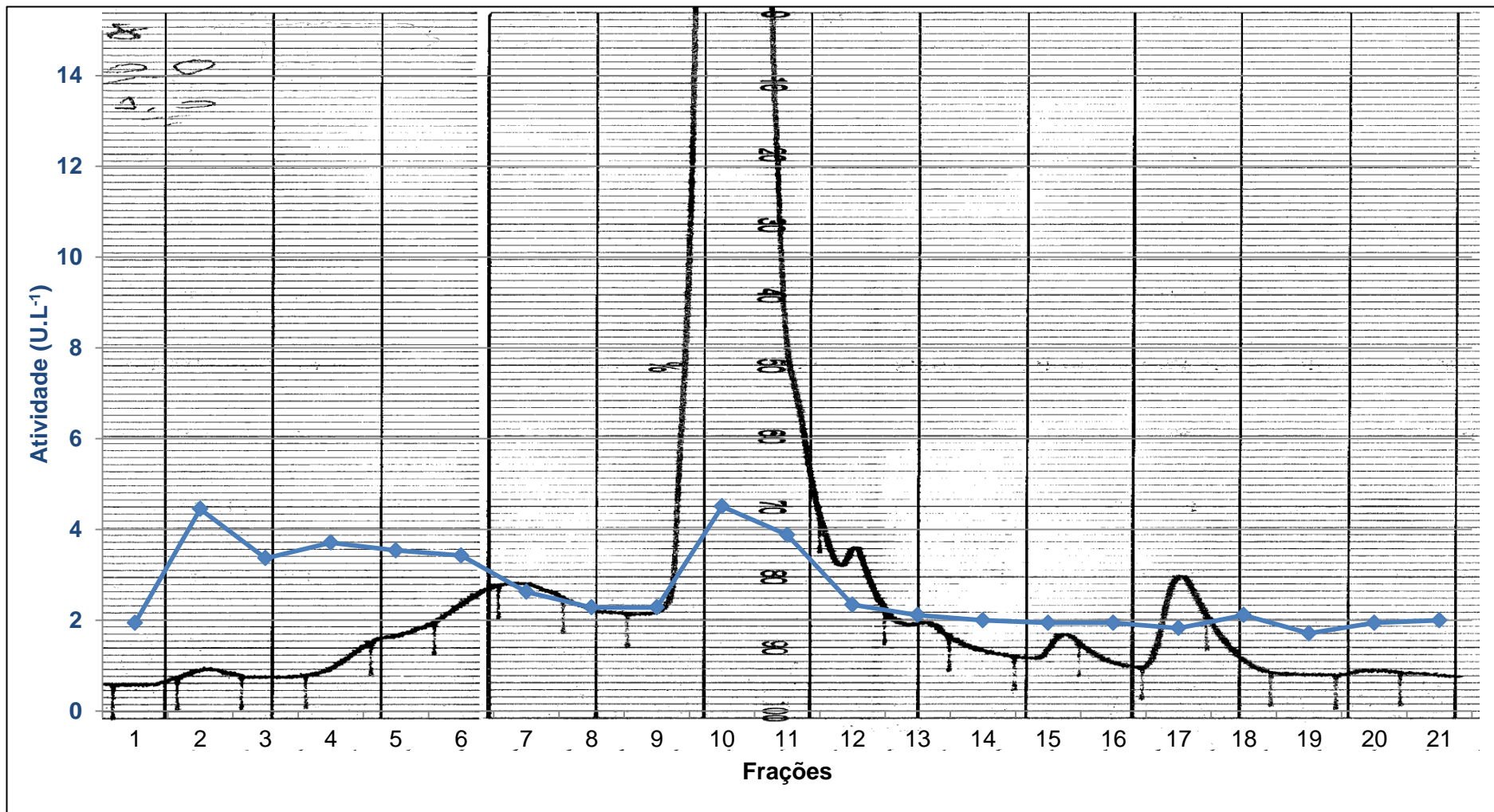
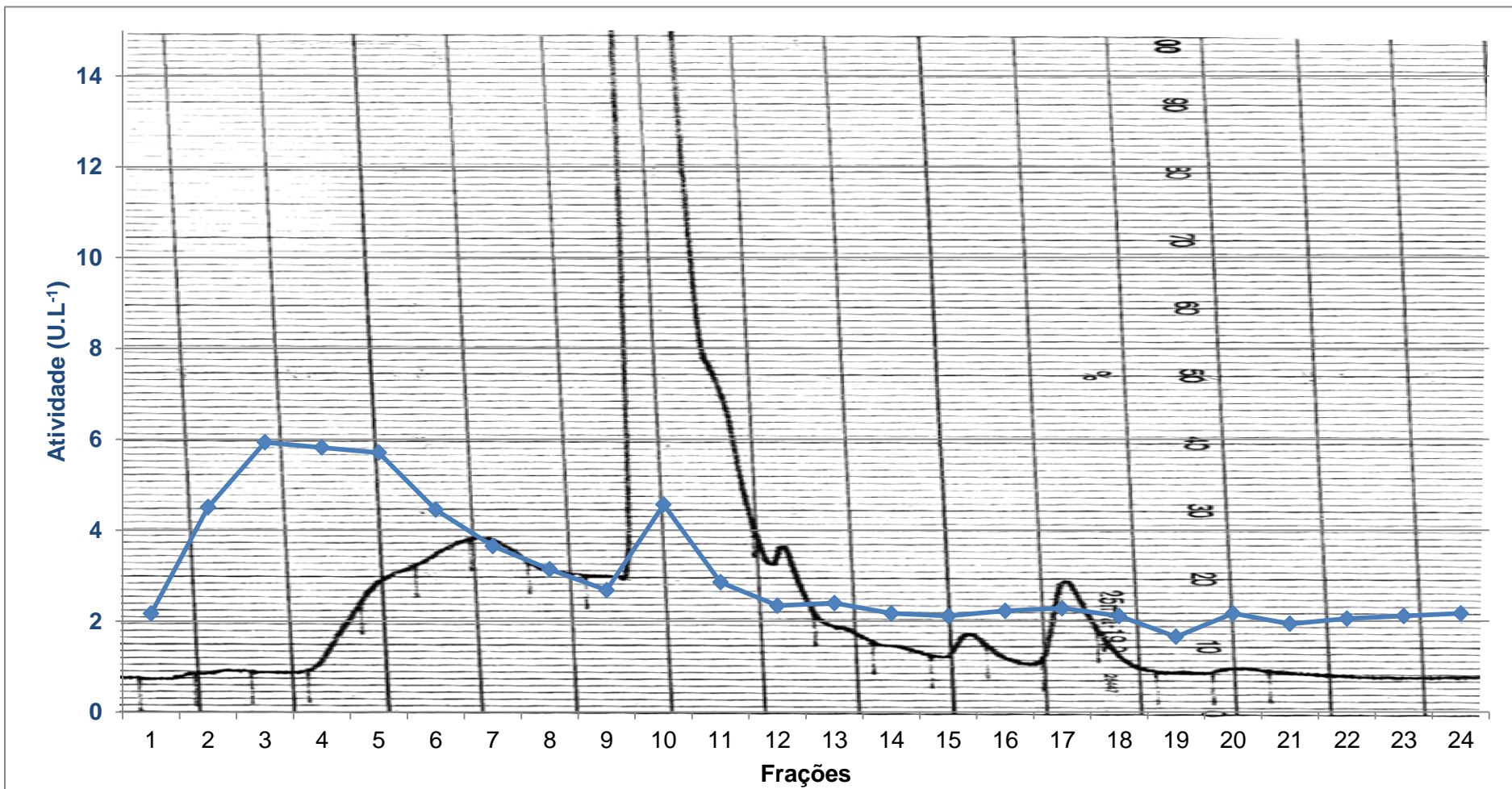


Figura 29 - Perfil da cromatografia de Gel Filtração em coluna Superose® 12 HR 10/30 com extrato em 80% de saturação do cultivo com fonte de carbono glicerol. Tampão Tris-HCl 0,02mol.L<sup>-1</sup> pH = 8,0. Fluxo 30mL/h, temperatura 25°C. A linha em preto corresponde à absorção a 280 nm.



**Figura 30 - Perfil da cromatografia de Gel Filtração em coluna Superose® 12 HR 10/30 com extrato em 80% de saturação do cultivo com fonte de carbono óleo de oliva. Tampão Tris-HCl 0,021,0mol.L<sup>-1</sup> pH = 8,0. Fluxo 30mL/h, temperatura 25°C. A linha em preto corresponde à absorção a 280 nm.**

toda sua atividade enzimática (Figura 31). Isso indicou novamente a existência de duas diferentes lipases produzidas por esse microrganismo.

Em contrapartida, as frações concentradas a partir do extrato de 60% de saturação que ainda possuíam atividade foram aplicadas na coluna de troca iônica e geraram outras frações que não responderam bem à estratégia de purificação. Nenhum pico foi retido na coluna para todos os pools testados para essa fração de saturação (Figura 32).

Analisando quantitativamente os resultados produzidos por essa estratégia experimental (Tabela 14), observou-se que inicialmente o meio contendo glicerol, embora tenha uma atividade por volume de sobrenadante menor do que a do óleo de oliva possui maior atividade específica do que o sobrenadante de cultivo contendo o óleo. Isso particularmente é bastante interessante visto que utilizando de resíduo contendo glicerol como fonte de carbono para produzir lipase ao invés de óleo de oliva essa produção poderá requerer menores etapas de purificação para a obtenção da enzima.

Esse fato reforça o uso de *Moniliella spathulata* R25L270 como organismo fonte de lipase visto que ele possivelmente poderia não somente utilizar um resíduo industrial para produzir o catalisador lipolítico que retornaria no processo, reduzindo o custo final de operação, mas também poderia produzir o bioproduto mais puro do que utilizando a fonte de carbono mais cara, nesse caso o óleo, barateando o processo mais uma vez.

Notou-se também que de modo geral o rendimento médio das purificações foi extremamente baixo ( $\bar{x}= 13,4\%$ ) (Tabela 14). A cromatografia de troca iônica não apresentou um perfil de eluição interessante, através da falta de ligação de algumas proteínas junto à coluna, liberando um pool de lipases ativa em basicamente uma fração, refletindo em um baixo fator médio de purificação ( $\bar{x}=5,67$ ) (Tabela 14).

#### **12.4.3.3.Cromatografias de afinidade**

Percebeu-se que a atividade total das frações que continham lipases da técnica de troca iônica que também vieram de um sobrenadante de cultivo utilizando de óleo de oliva como fonte de carbono já era bastante baixa depois de etapa de purificação ( $\bar{x}= 2,92 \text{ U.L}^{-1}$ ). Portanto, como a atividade total seguia uma tendência geral de queda, sem apresentar etapas com rendimento de purificação significativos, decidiu-se não testar essas amostras com atividade baixa em uma nova etapa de



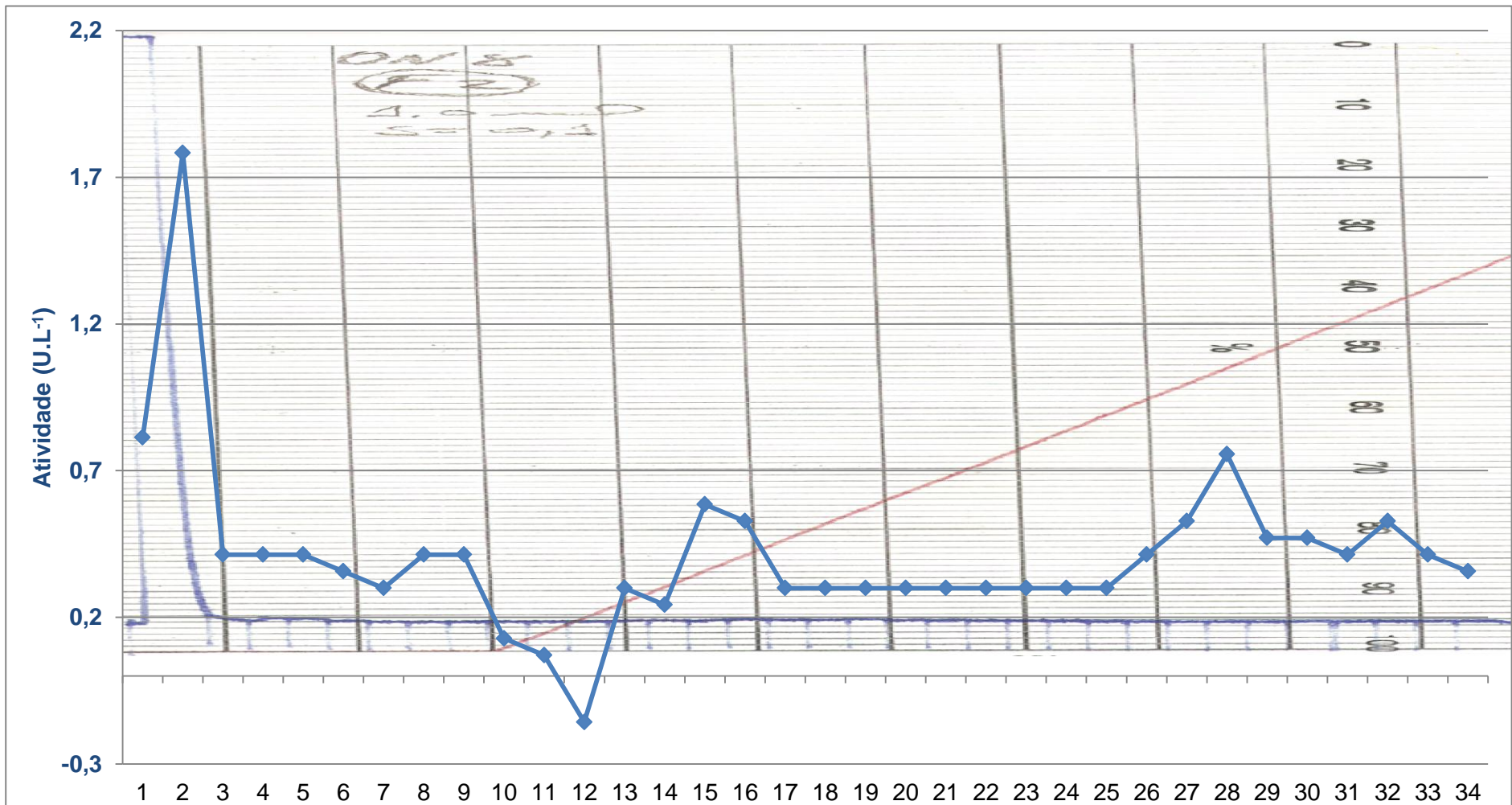


Figura 31 - Cromatografia de troca aniônica do extrato de 80 % de saturação do pool das frações 4 5 e 6 obtidas na gel filtração de cultivo com glicerol. Coluna mono-Q. A:Tris HCl 0,05mol.L<sup>-1</sup> pH 8,0; B:Tris HCl 0,05mol.L<sup>-1</sup> + NaCl 1,0mol.L<sup>-1</sup> pH 8,0. Fluxo 1,0mL/min.

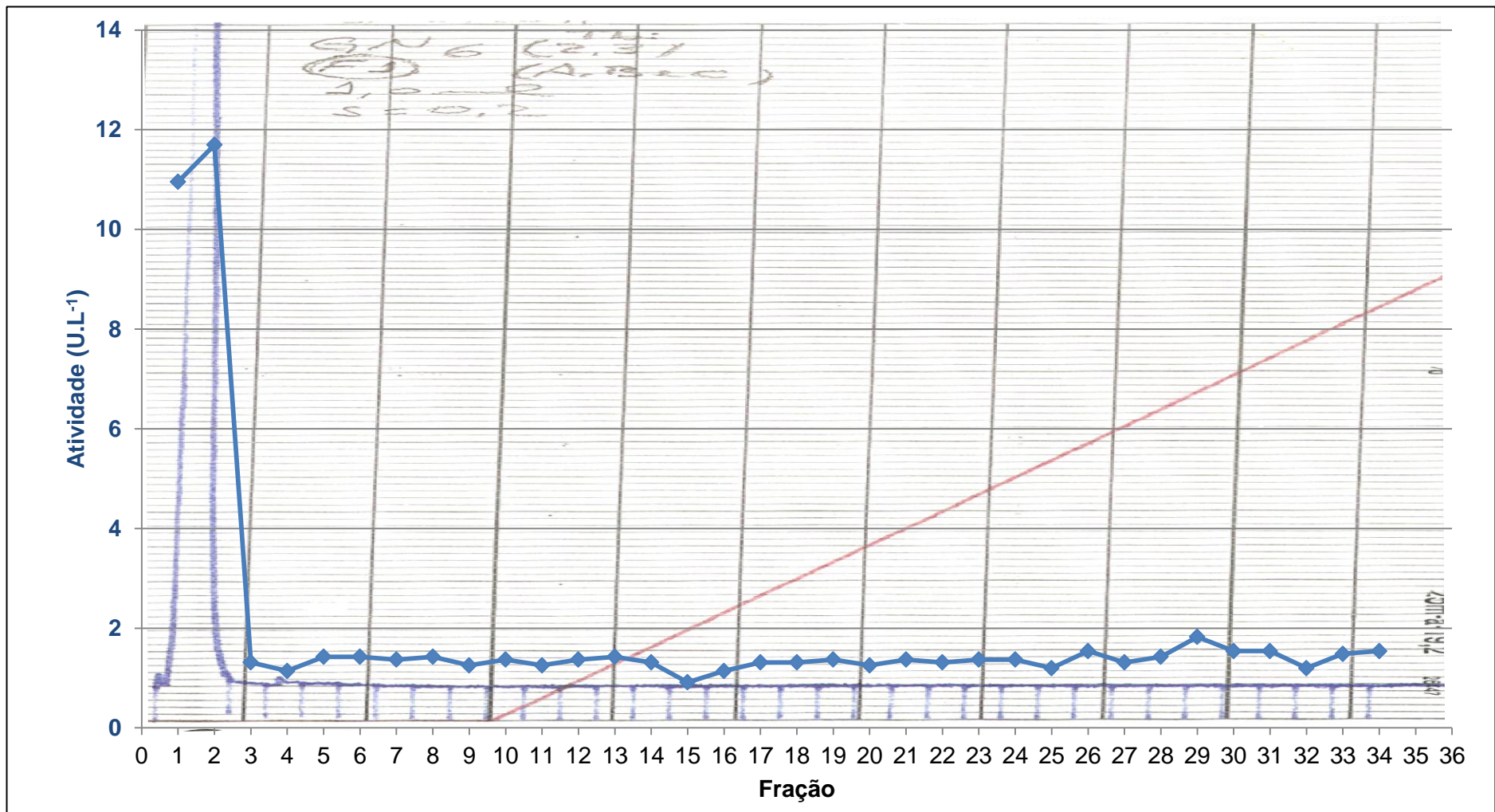


Figura 32 - Cromatografia de troca aniônica do extrato de 60 % de saturação do pool das frações 2 e 3 obtidas na gel filtração de cultivo com glicerol. Coluna mono-Q. A: Tris HCl 0,05mol.L<sup>-1</sup> pH 8,0; B: Tris HCl 0,05mol.L<sup>-1</sup> + NaCl 1,0mol.L<sup>-1</sup> pH 8,0. Fluxo 1,0mL/min.

**Tabela 14 – Tabela de Rendimento de purificação do planejamento de purificação do fluxograma do Anexo 1**

	<b>G</b>						<b>O</b>					
Atividade (U.L <sup>-1</sup> )	37,834						250,620					
Dosagem (mg/mL)	258						314					
Atividade normalizada (U.g <sup>-1</sup> )	0,1						0,8					
	<b>GN6</b>			<b>GN8</b>			<b>ON6</b>			<b>ON8</b>		
Atividade (U.L <sup>-1</sup> )	64,792			78,496			68,906			97,449		
Dosagem (mg/mL)	61			276			183			214		
Atividade normalizada (U.g <sup>-1</sup> )	1,1			0,3			0,4			0,5		
Fator de purificação	11			3			0,5			0,6		
Rendimento atv. (%)	171,3			207,5			27,5			38,9		
	<b>GN6F1</b>	<b>GN6F2</b>	<b>GN6F3</b>	<b>GN8F1</b>	<b>GN8F2</b>	<b>GN8F3</b>	<b>ON6F1</b>	<b>ON6F2</b>	<b>ON6F3</b>	<b>ON8F1</b>	<b>ON8F2</b>	<b>ON8F3</b>
Atividade (U.L <sup>-1</sup> )	16,942	22,759	5,306	33,036	24,477	2,415	2,396	4,660	1,560	2,625	4,564	1,731
Dosagem (mg/mL)	9,7	23,0	37,7	8,0	17,0	42,3	6,0	13,4	44,2	4,6	10,4	40,6
Atividade normalizada (U.g <sup>-1</sup> )	0,024	0,031	0,013	0,089	0,019	0,005	0,027	0,013	0,004	0,035	0,017	0,004
Fator de purificação	0,02	0,03	0,01	0,31	0,07	0,02	0,07	0,03	0,01	0,08	0,04	0,01
Rendimento atv. (%)	26,149	35,126	8,190	42,087	31,182	3,077	3,478	6,762	2,263	2,693	4,684	1,776
	<b>GN6F1</b>	<b>GN6F2</b>	<b>GN6F3</b>	<b>GN8F1</b>	<b>GN8F2</b>	<b>GN8F3</b>	<b>ON6F1</b>	<b>ON6F2</b>	<b>ON6F3</b>	<b>ON8F1</b>	<b>ON8F2</b>	<b>ON8F3</b>
	<b>T1*</b>	<b>T1*</b>	<b>T1*</b>	<b>T1*</b>	<b>T1*</b>	<b>T1*</b>	<b>T1*</b>	<b>T1*</b>	<b>T1*</b>	<b>T1*</b>	<b>T1*</b>	<b>T1*</b>
Atividade (U.L <sup>-1</sup> )	2,339	7,075	4,812	7,113	3,195	1,967	1,633	1,700	1,567	1,600	1,767	1,603
Dosagem (mg/mL)	2,7	9,1	15,8	3,9	14,6	37,4	2,9	7,1	37,4	0,8	4,6	31,1
Atividade normalizada (U.g <sup>-1</sup> )	0,635	0,251	0,034	0,843	0,168	0,006	0,082	0,065	0,004	0,350	0,100	0,006
Fator de purificação	26,37	10,40	1,39	9,44	1,88	0,07	3,00	2,39	0,15	10,02	2,85	0,16
Rendimento atv. (%)	13,81	31,09	90,68	21,53	13,05	81,42	68,16	36,48	100,46	60,96	38,71	92,65

**Legenda: N = precipitação por sulfato de amônio; 6= fração de 60% de saturação; 8= fração de 80% de saturação; F = cromatografia de gel filtração; 1 = 1º pool de atividades (frações 2 e 3); 2 = 2º pool de atividades (frações 4 a 7); 3 = 3º pool de atividades (frações 10 e 11); T = Cromatografia de Troca Iônica; 1\* = único pool de atividades da troca iônica.**

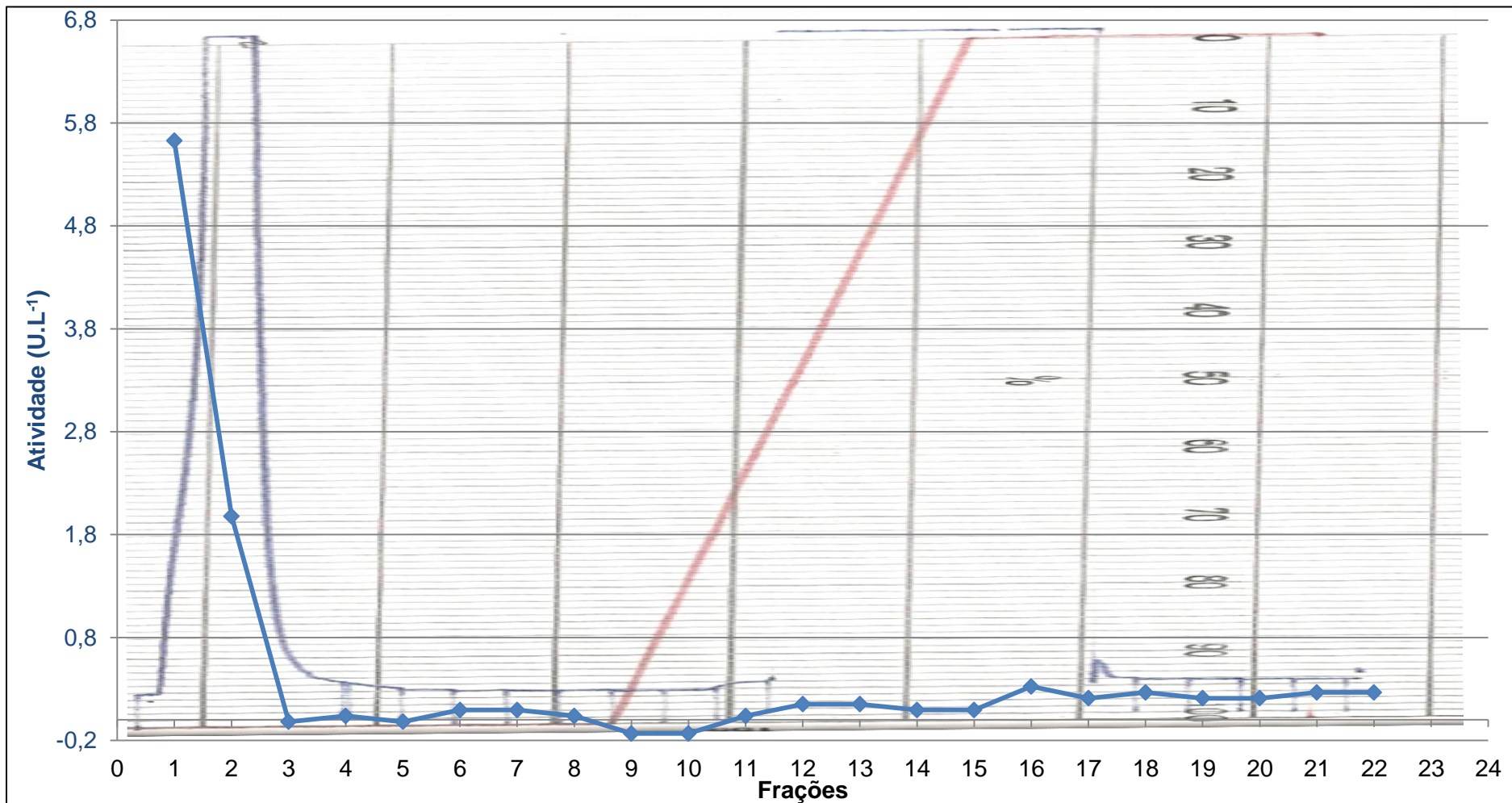
purificação. Em contrapartida, tomaram-se apenas três amostras para testar a cromatografia de afinidade (GN6F1T1; GN6F2T1 e GN6F3T1) para verificar o comportamento dessas amostras frente uma nova técnica de purificação (Anexo 1).

Foram recolhidas e concentradas as frações dos pools com atividade que passaram pela técnica da troca iônica individualmente que foram isolados a partir do extrato do sobrenadante de cultivo com glicerol com 60% de saturação, pois depois da cromatografia de troca iônica elas apresentavam atividades totais possíveis de serem detectadas em três pools distintos. Resolveu-se aplicar os pools em coluna de afinidade por heparina devido à técnica ter se mostrado útil na separação de algumas lipases e outras enzimas correlacionadas (Farooqui et al., 1998). Entretanto aqui, as amostras não possuiriam nome específico.

A heparina é um glicosaminoglicano e um polímero altamente sulfatado, possuindo uma carga líquida negativa extremamente grande o que confere a essa substância capacidade de interagir fortemente com várias outras macromoléculas. O mecanismo de interação proposto para sua interação pode ser de duas formas: ligação com cargas positivas em modo cooperativo ou ligação específica, por exemplo, com antitrombina III (Farooqui et al., 1998).

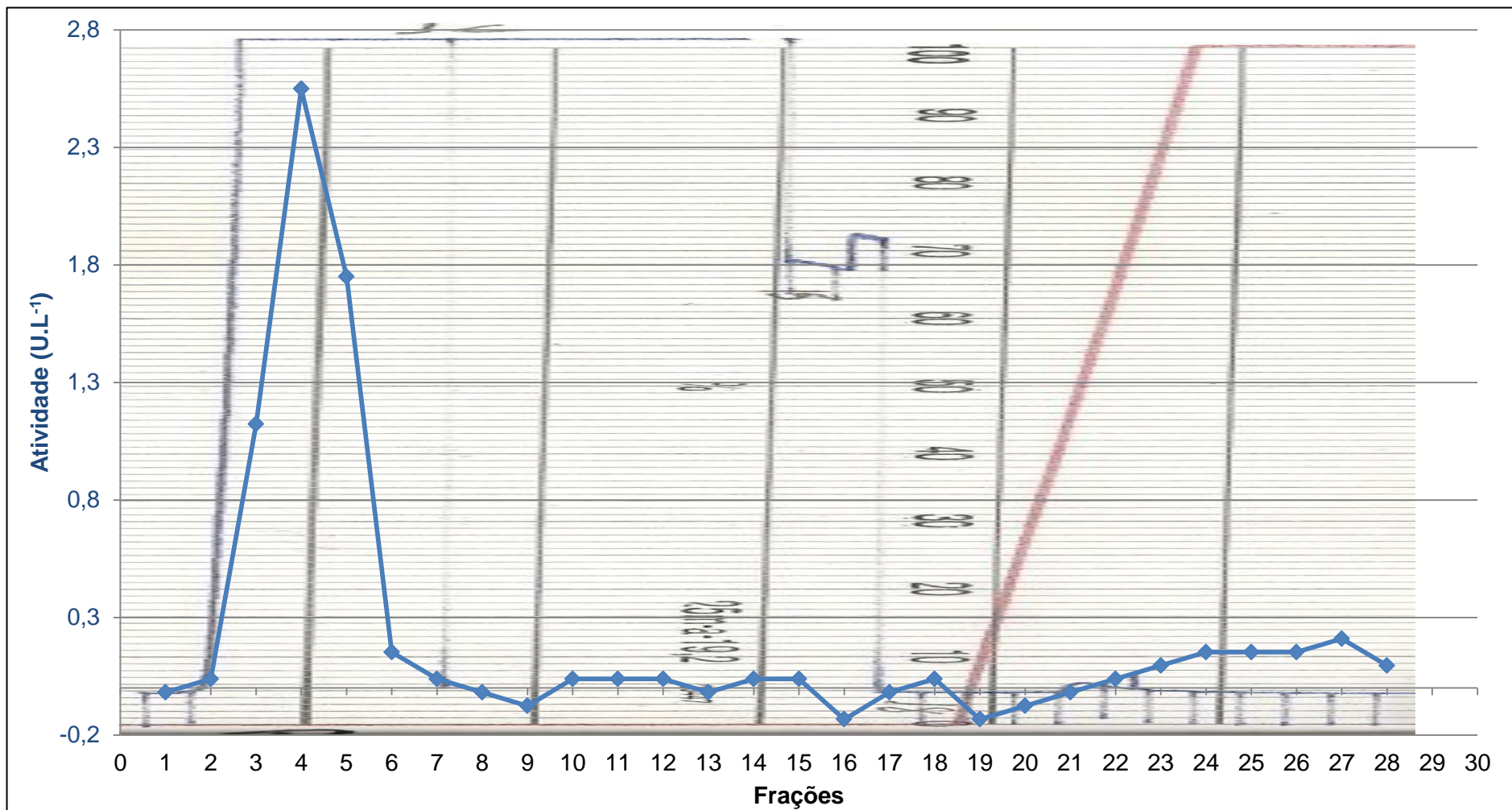
As primeiras amostras testadas (GN6F1T1; GN6F2T1), se ligaram parcialmente na coluna (Figura 33). Como o mecanismo de interação da heparina não é somente específico de afinidade, forças de natureza iônica das partículas podem também ter desempenhado papel interessante no estabelecimento das interações da proteína para com a fase fixa. A lipase poderia estar glicosilada a apresentando grande carga líquida negativa, exibindo agrupamentos não interativos com uma superfície também negativa ou específica da heparina, o que explicaria a atividade ter sido detectada pelas proteínas eluídas nos primeiros picos (Figura 33 e Figura 34). Inversamente, as proteínas interativas com a fase fixa contidas nos picos recolhidos em gel filtração nas frações de 2 a 7 podem ter carga líquida positiva (Figura 34). Na Figura 38a foram percebidas grandes quantidades de proteínas nas amostras G e O e nos pellets O60, G60, O80 e G80, e que não existem proteínas de peso molecular na Figura 38b, depois de feita a gel filtração e troca iônica nas amostras contendo atividade. Esses dados corroboram a hipótese de agregação da lipase, juntos da Figura 35.

A média de peso molecular encontrada na Figura 35b é bem mais alta do que se encontra para uma lipase (Sharma et al., 2001) sugerindo a agregação da lipase. Também o arraste da fração GN6F2T1\* na mesma Figura pode sugerir que uma da

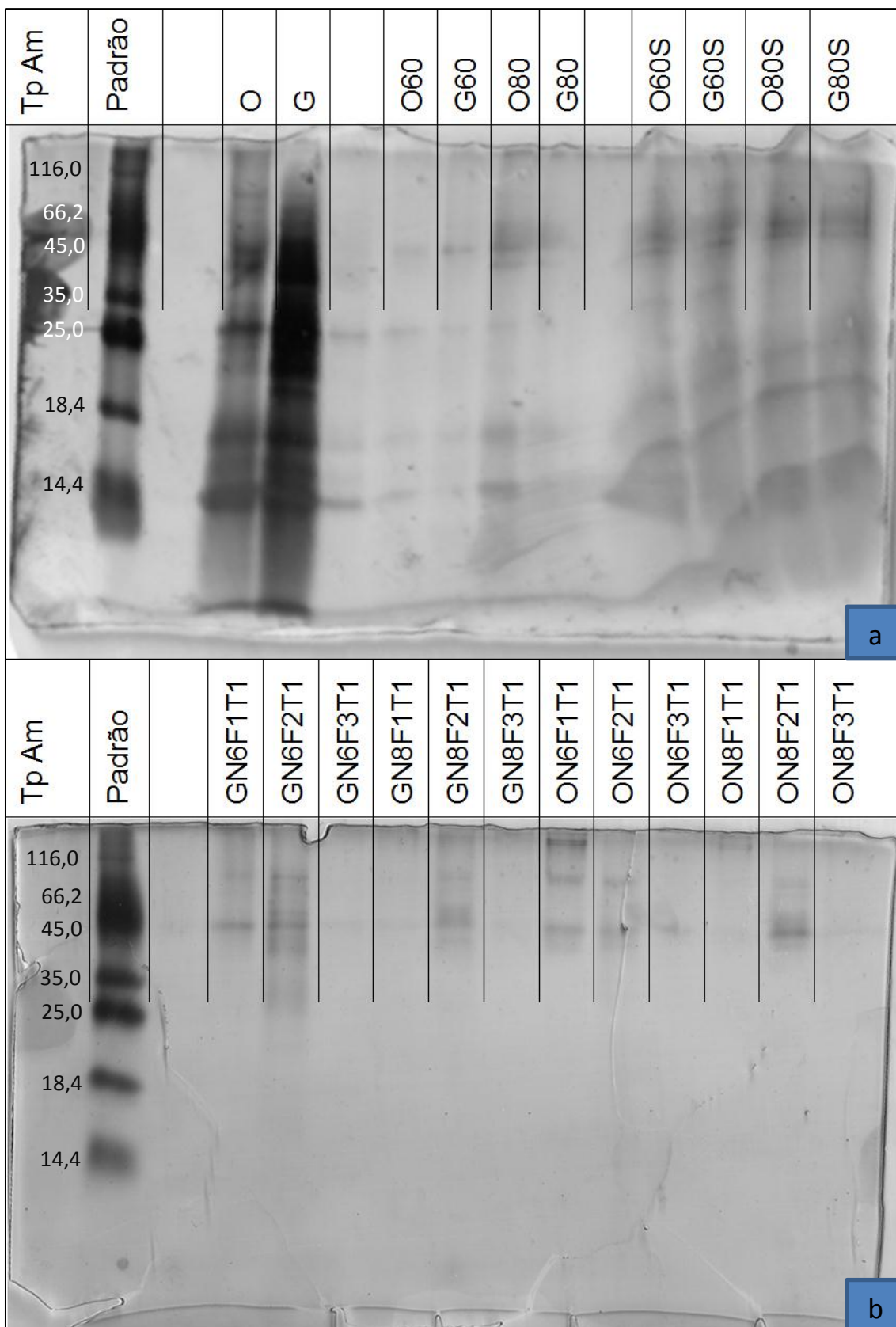


**Figura 33 - Cromatografia de Afinidade à Heparina do pool de atividade recolhido na cromatografia de troca iônica advindo do pool das frações 2 e 3 da cromatografia de gel filtração do extrato de 60 % de saturação a partir do sobrenadante de cultivo com glicerol. Coluna HiTrap Heparin HP (GE Healthcare®) A: 0,02mol.L<sup>-1</sup> de Tris-HCl pH 8,0 contra um gradiente 0-100% de B, 0,02mol.L<sup>-1</sup> de Tris-HCl com 1,0mol.L<sup>-1</sup> de NaCl pH 8,0 a partir de 15 até 25 min com fluxo de 60,0mL/h.**





**Figura 34 - Cromatografia de Afinidade à Heparina do pool de atividade recolhido na cromatografia de troca iônica advindo do pool das frações 4, 5 e 6 da cromatografia de gel filtração do extrato de 60 % de saturação a partir do sobrenadante de cultivo com glicerol. Coluna HiTrap Heparin HP (GE Healthcare®) A: 0,02mol.L<sup>-1</sup> de Tris-HCl pH 8,0 contra um gradiente 0-100% de B, 0,02mol.L<sup>-1</sup> de Tris-HCl com 1,0mol.L<sup>-1</sup> de NaCl pH 8,0 a partir de 15 até 25 min com fluxo de 60,0mL/h.**



**Figura 35 - Eletroforese das frações com atividade lipásica.** (a) frações de sobrenadante de cultivo e da precipitação por sulfato de amônio sendo os sobrenadantes com sufixo S e pellets sem sufixo. (b) frações recolhidas depois da cromatografia de troca iônica. Gel desnaturante 12,5% contendo SDS e corrido a 120V. Coloração por prata.

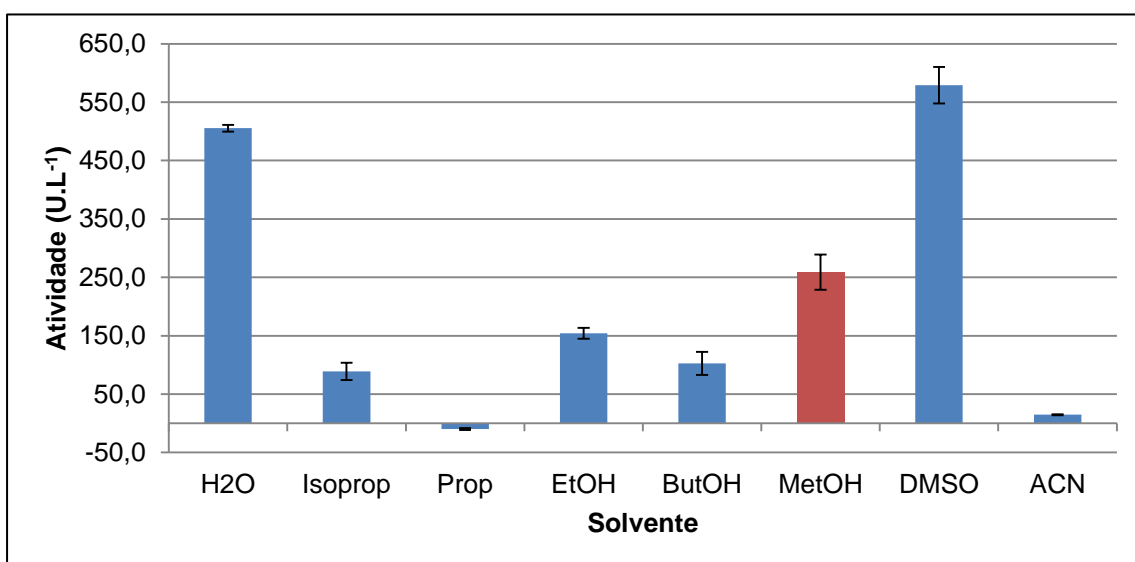
bandas que representam o agregado pode ter se decomposto em frações menores durante o processo da eletroforese, exibindo o padrão de arraste.

#### 12.4.3.4. Cromatografia de fase reversa: Estudo do efeito de diferentes solventes orgânicos na atividade lipásica para escolha da fase móvel da cromatografia de fase reversa

Devido à técnica de cromatografia de afinidade não ter sido bem sucedida para purificar a lipase, já que ela não isolou frações bem resolvidas decidiu-se por retirá-la da série experimental e tentar utilizar de outras metodologias para o isolamento da biomolécula.

Sendo assim, resolveu-se investigar outros solventes para purificar a fração obtida na cromatografia de gel filtração pela cromatografia de fase reversa para que não existisse inativação da enzima. Nesse estudo observou-se o extremo efeito deletério exercido na atividade lipásica pela acetonitrila explicando os resultados das cromatografias iniciais utilizando esse solvente no tampão B (Figura 21 e Figura 22).

Ainda assim, quando se utilizou o metanol (Figura 36, em vermelho) para uma nova tentativa de purificação nas mesmas condições anteriores, os resultados não foram satisfatórios também (dados não mostrados). A escolha do metanol foi devida a impossibilidade do emprego do DMSO devido à sua elevada viscosidade.



**Figura 36 - Efeito de solventes puros na atividade lipásica de amostras de sobrenadante livre de células de cultivos de *M. spathulada* R25L270.** Isoprop = isopropanol; Prop = propanol; EtOH = etanol; ButOH = butanol; MetOH = metanol, DMSO = dimetilsulfóxido, ACN = acetonitrila.

Esses resultados já apontam as lipases de *M. spathulatha*, como sensíveis a solventes orgânicos. Como a adição dos solventes testados na Figura 36 junto à lipase foi feita em uma única etapa e a concentração final foi bastante elevada,

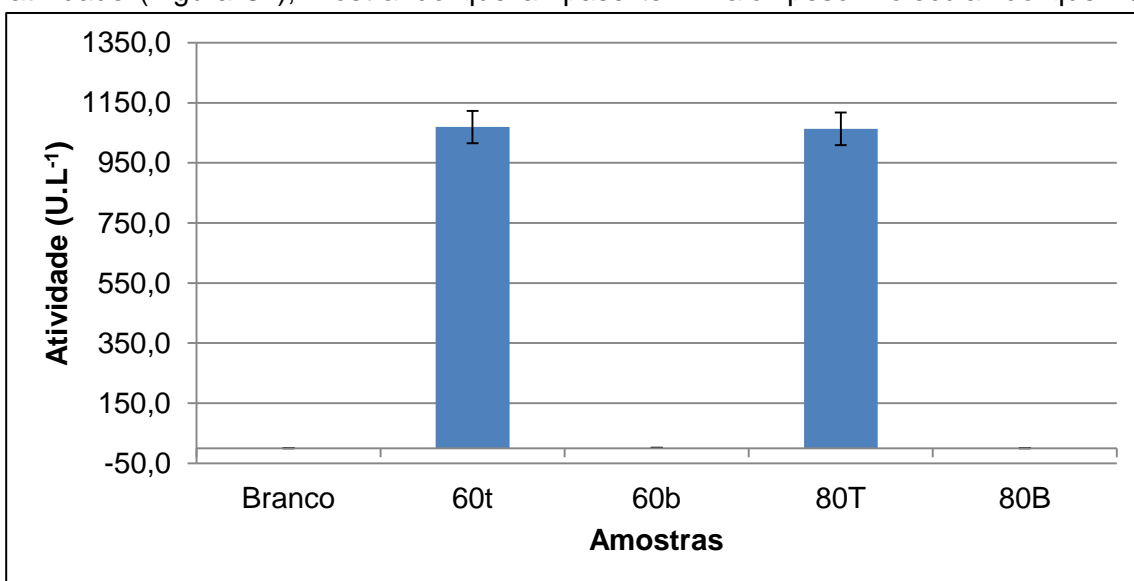


provavelmente a enzima pode ainda ser parcialmente resistente a solventes orgânicos, porém não em condições em que foram testadas. Devido à adição de solvente orgânico em uma única etapa já ter sido reportada como nociva para a lipase em termos de atividade, se faz a adição do solvente no meio catalítico em etapas em reatores (Tan et al., 2010; Nie et al., 2006). Embora esse tenha sido um estudo de estabilidade preliminar com o intuito de melhorar a purificação da enzima, percebeu-se pelos resultados alcançados que é merecida uma abordagem sobre os efeitos inibitórios dos solventes orgânicos sobre a enzima, tanto para ajudar caracterização da enzima, mas também para a purificação da mesma.

O estudo da estabilidade sobre a enzima pura de *Rhizopus oryzae* revelou que o metanol foi aquele solvente (30%, 1h) dentre 13 que proporcionou os valores de atividade mais baixos (Hiol, et al., 2000). Para lipase de *Cryptococcus sp.* o benzeno sobrepôs o efeito inibitório do metanol sobre esse catalizador, depletando a atividade da enzima na concentração de 10%. Para a mesma enzima, o DMSO apresentou efeitos de aumento na atividade (Kamini et al., 2000).

#### 12.4.4. Separação por ultrafiltração

Como as metodologias cromatográficas não foram bem sucedidas para a purificação da lipase, estudou-se a eficiência do sistema de filtração molecular para a purificação. A partir do extrato precipitado, ressuspendido e ultrafiltrado, percebeu-se que as amostras retidas no sistema de ultrafiltração foram as únicas que apresentaram atividade (Figura 37), mostrando que a lipase tem maior peso molecular do que 10



**Figura 37 - Padronização do sistema de filtração Amicon de 30kDa com amostras avindas da precipitação por sulfato de amônio.** 60t = fração de 60 % de saturação retida; 60b = fração de 60 % de saturação filtrada; 80T = fração de 80 % de saturação retida; 80B = fração de 80 % de saturação filtrada.

kDa. Os dados vão de encontro com a literatura que reporta valores médios de peso molecular esperados para lipase de 30-50kDa (Sharma et al., 2001). Os dados também estão de acordo com os resultados observados na eletroforese (Figura 35).

Levando em consideração todas as estratégias adotadas até então, percebeu-se que aquelas em que se obteve maior sucesso na separação de diferentes frações de lipase contendo atividade foram: a precipitação de sulfato de amônio, a ultrafiltração e cromatografia de gel filtração. Sendo assim, a fim de se purificar a enzima para proceder a caracterização parcial das diferentes frações isoladas, decidiu-se combinar as estratégias nesta ordem apresentada.

#### **12.4.5. Purificação parcial das lipases através das técnicas padronizadas mais efetivas.**

Para a purificação final da enzima a partir de um novo cultivo de *M. spathulata* R25L270 em óleo de oliva deixou-se a etapa cromatográfica como a última metodologia. Durante a execução dessa etapa, ocorreu a mudança das condições experimentais. Na disponibilidade da ultracentrífuga para fazer o isolamento da fração precipitada pretendeu-se aumentar a força empregada na amostra para recolher a fração não recolhida à mais baixa rotação até então. Percebeu-se na execução dessa etapa que devido a isso o perfil das proteínas na cromatografia foi alterado (Figura 38).

Inicialmente percebeu-se que a cromatografia do extrato de 60% teve suas frações iniciais mais convoluidas, com menor resolução dos picos (Figura 38a). A purificação do extrato de 80% apresentou o ombro relativo às frações 3 a 7 muito aumentados (Figura 38b) em relação às outras cromatografias anteriores (Figuras 22–23; 32–33). Percebeu-se também a sobreposição das frações ativas com o cromatograma ficou bastante prejudicada.

Notou-se, que os picos de atividade não ficaram bem resolvidos, sobretudo para a fração de 80%. Então os picos de atividade mais elevada 9, 10, 11 e 12 foram reunidos para a caracterização parcial. Também as frações 2 e 3 obtida a partir da precipitação inicial a 60% de saturação foram agrupadas para serem caracterizadas. Provavelmente esse efeito pode ter acontecido devido a uma agregação na coluna que ocorrera pela falta de sal no tampão de eluição (Healthcare, 2006).

Notou-se que o rendimento das metodologias para purificar as lipases das frações de 60 e 80% foram bastante similares, exceto para a etapa de filtração com amicon Tabela 15. Possivelmente a lipase fora inativada pela metodologia adotada.

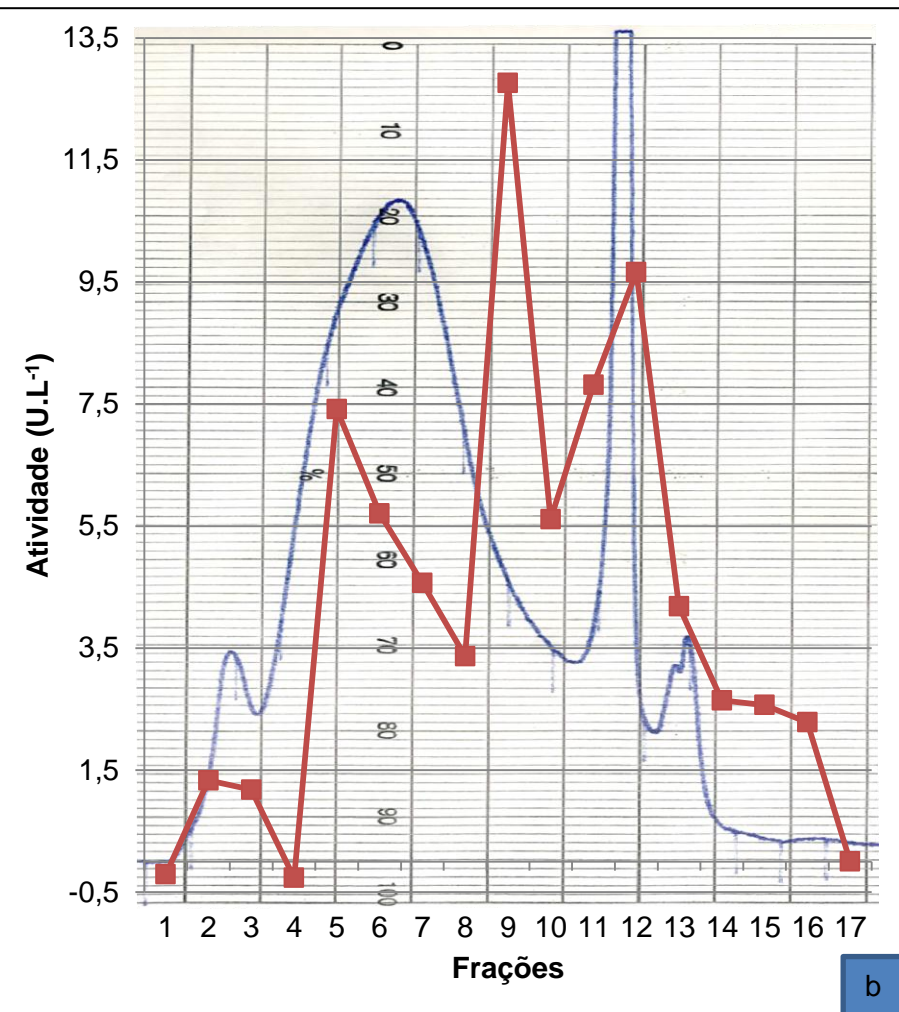
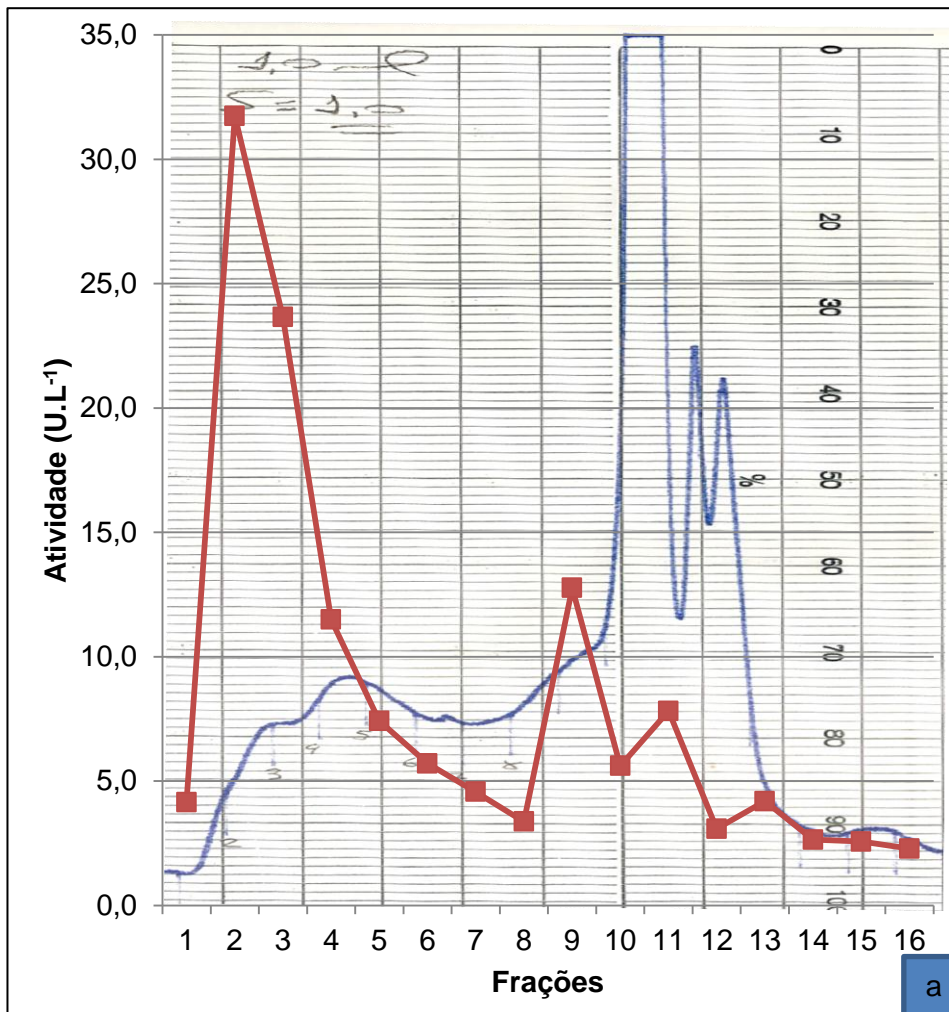


Figura 38 - Perfil da cromatografia de Gel Filtração em coluna Superose® 12 HR 10/30 dos extratos do cultivo com fonte de carbono óleo de oliva. Tampão Tris-HCl 0,02 mol.L<sup>-1</sup> pH = 8,0. Fluxo 30mL/h, temperatura 25°C. A linha em azul corresponde à absorção a 280 nm (a) Extrato de 60 % de saturação; (b) Extrato de 80 % de saturação.

Percebeu-se também que a purificação da amostra com 60% de saturação foi muito mais efetiva para a enzima dessa fração do que para a sua análoga de 80%, pois o fator de purificação foi superior para todas as etapas de purificação para essa fração quando em comparação com a outra.

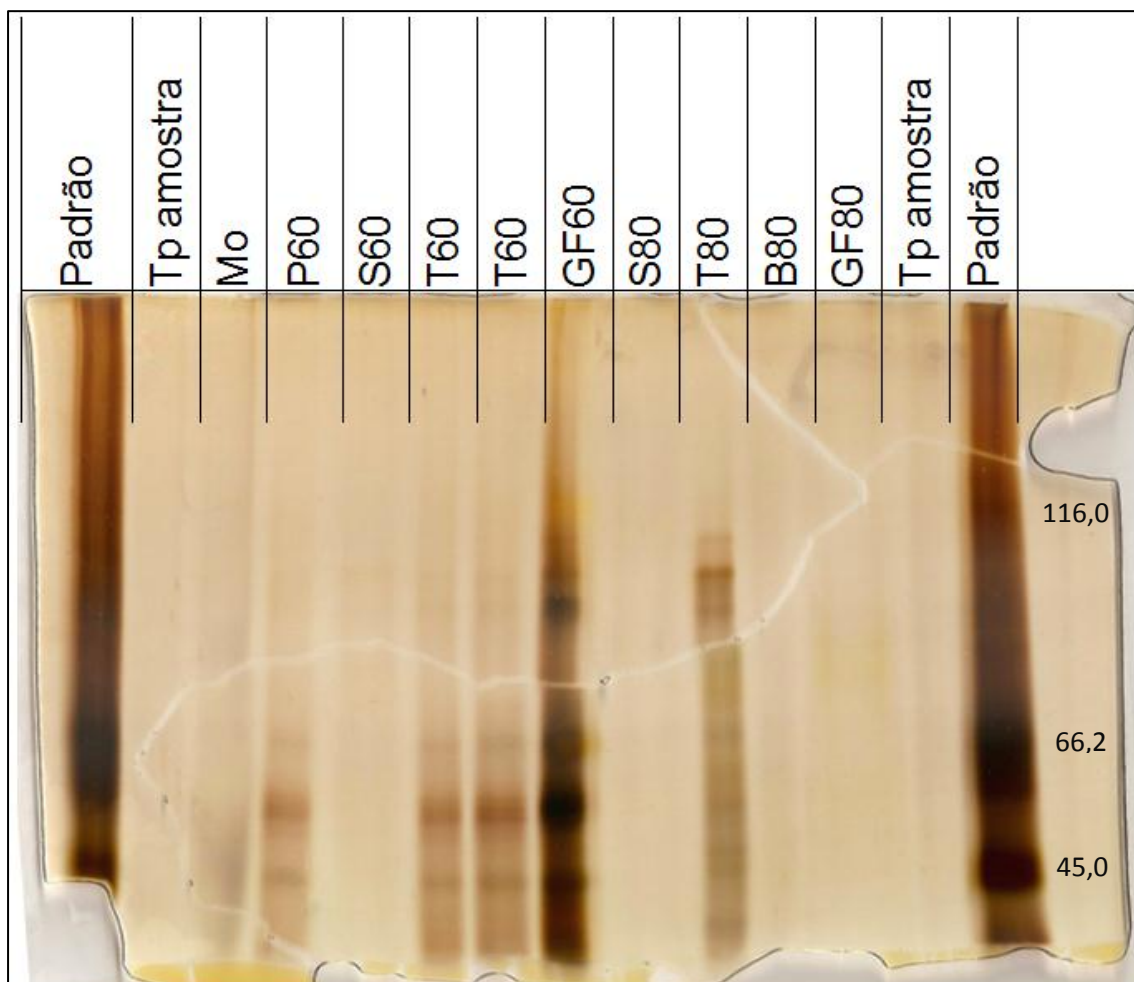
A combinação de precipitação por sulfato de amônio e cromatografia de gel filtração proporcionou rendimento de 22% para a lipase de *Pythium ultimum* 144 (Mozaffar & Wette, 1993). As duas lipases de *Candida cylindracea* foram extraídas conjuntamente do meio de cultura através de precipitação com etanol apresentando 84% de rendimento (Rúa, et al., 1993). A lipase de *Rhizopus oryzae* foi purificada com rendimento de 80% (Hiol et al., 2000). Esses últimos valores são mais próximos dos encontrados para ambas as frações isoladas de *M. spathulata*.

A eletroforese das frações purificadas foi alterada para permitir maior visualização daquelas de maior massa molecular. Pela Figura 39 foi possível notar que não existiu mudança no padrão de proteínas dentro de uma mesma fração de saturação quando a amostra foi purificada através das técnicas empregadas. Notou-se também que o extrato de 80% de saturação possui bandas bastantes distintas do extrato de 60%, sugerindo que possa haver de fato a presença de diferentes lipases em cada um dos extratos. Porém, existiu uma banda consensual para frações advindas de ambos extratos de peso molecular ~55-60KDa, sugerindo esse como o peso molecular da lipase em cada fração.

As técnicas empregadas para purificação parcial de cada um dos extratos de *Moniliella spathulata*, estão presentes como as mais comumente encontradas em trabalho de revisão de purificação de lipases (Saxena et al., 2003, Sharma et al., 2001). A precipitação por sulfato de amônio é metodologia utilizada em mais de 40% dos casos como estratégia de concentração dessas proteínas (Saxena et al., 2003). Dentre as técnicas cromatográficas aquela que demonstrou maior eficiência, gel filtração, aparece como a mais utilizada em metodologias de purificação para 60% dos casos (Sharma et al., 2001).

Em metodologia utilizando de precipitação por sulfato de amônio e gel filtração, a lipase de *Bacillus stearothermophilus* AB-1 foi purificada parcialmente utilizando 60% de saturação no sobrenadante para isolar a enzima, resultado similar ao encontrado nesse trabalho (Abada, 2008). Para a purificação de lipase de *Pseudomonas*, foi utilizada a precipitação por sulfato de amônio a 60% de saturação para isolar a enzima com rendimento de 59%, cujo resultado foi melhorado para 83% empregando antiespumante Silicone 21 (Kanwar, et al., 2002).

Combinando precipitação em sulfato de amônio e cromatografia de troca iônica em coluna DEAE celulose, a lipase de *Microbacterium luteolum* foi parcialmente purificada 35,64 vezes com rendimento de 3,0%. O rendimento da etapa de precipitação alcançou 5,47% (Joseph, et al, 2012).



**Figura 39 - Eletroforese das frações purificadas na última estratégia com 10 % de acrilamida:** Tp= Tampão; Mo – Meio de cultura; P60 = Pellet de 60 % de saturação; S60 e S80 = Sobrenadante de 60 % e 80 % de saturação; T60 e T80 = subfração retida em amicom da fração de 60 e 80 % de saturação; B80 = subfração não retida em amicom da fração de 80 % de saturação; GF 60 e GF 80 = Frações eluídas em gel filtração dos extratos de 60 e 80 % de saturação. Gel desnaturante contendo SDS e corrido a 120V. Coloração por prata.

O emprego da metodologia de precipitação em sulfato de amônio e cromatografia de troca iônica em coluna DEAE celulose-32 para purificação de diferentes lipases de *Geotrichum* sp. SYBC WU-3 proporcionou rendimento de 20,4% para lipase A e 9,2% para lipase B (Cai, et al., 2009).

<b>Tabela 15– Rendimentos da purificação parcial padronizada de lipase a partir do cultivo com óleo de oliva</b>		
	<b>Sobrenadante de cultivo de óleo de oliva (O)</b>	
Atividade (U.L <sup>-1</sup> )	21,662	
Dosagem (mg/mL)	22,333	
Atividade normalizada (U.g <sup>-1</sup> )	0,970	
	<b>ON6</b>	<b>ON8</b>
Atividade (U.L <sup>-1</sup> )	18,771	19,437
Dosagem (mg/mL)	1,167	13,833
Atividade normalizada (U.g <sup>-1</sup> )	16,090	1,405
Fator de purificação	16,588	1,449
Rendimento atv. (%)	86,655	89,728
	<b>ON6Am</b>	<b>ON8Am</b>
Atividade (U.L <sup>-1</sup> )	15,652	9,053
Dosagem (mg/mL)	0,300	5,500
Atividade normalizada (U.g <sup>-1</sup> )	52,175	1,646
Fator de purificação	53,791	1,697
Rendimento atv. (%)	72,256	41,791
	<b>ON6AmGF</b>	<b>ON8AmGF</b>
Atividade (U.L <sup>-1</sup> )	8,150	8,408
Dosagem (mg/mL)	0,660	1,547
Atividade normalizada (U.g <sup>-1</sup> )	12,35	5,44
Fator de purificação	12,73	5,60
Rendimento atv. (%)	37,62	38,81

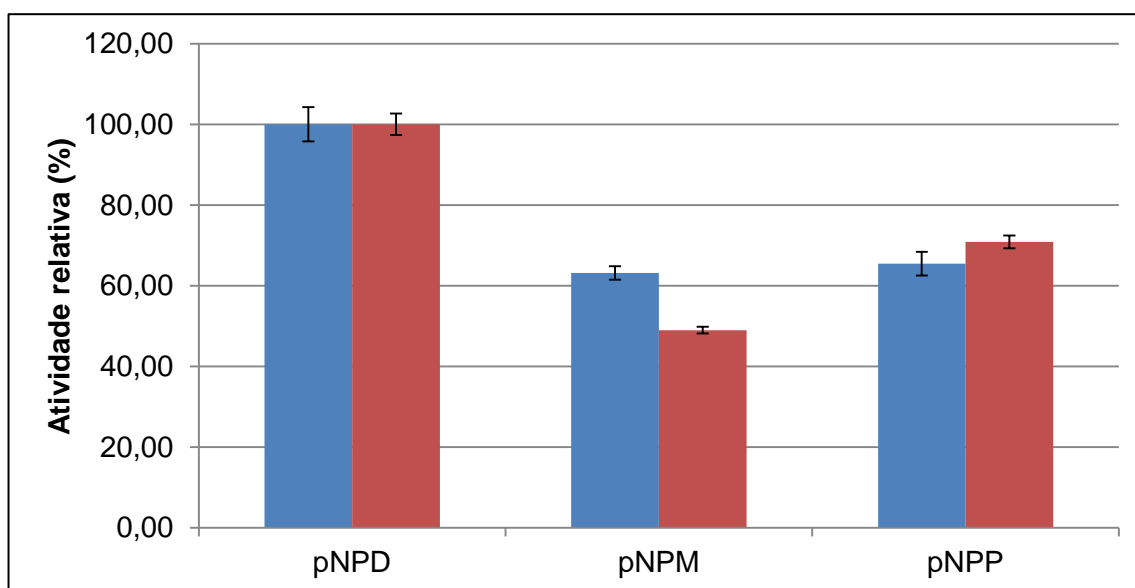
**Legenda:** ON6 = Precipitado de células com 60% de saturação; ON8 = Precipitado de células com 80% de saturação; ON6Am = Fração de 60% de saturação ultrafiltrada em amicon; ON8Am = Fração de 80% de saturação ultrafiltrada em amicon; ON6AmGF = Fração de 60% ultrafiltrada e cromatografada em gel filtração; ON8AmGF = Fração de 80% ultrafiltrada e cromatografada em gel filtração.

Lipases de *Geotrichum candidum* ATCC 34614 (I e II) e CMICC 335426 (a e b) (Sidebottom et al., 1991), *Candida cylindracea* (a e b) (Rúa et al., 1992), *Thermosyntropha lipolytica* (a e b) (Salameh & Wiegel, 2007) possuíam massas que não diferiam em 10kDa dos limites superior e inferior da faixa de peso molecular estimada para as faixa de massa das lipases purificadas de *Moniliella spathulata* R25L270. Além disso, o valor encontrado para o peso da lipase do organismo de estudo está situado dentro da faixa entre 5 e 65kDa abrangendo grande parte das lipases existentes (Sharma et al., 2001).

## 12.5. Caracterização da atividade enzimática das frações parcialmente purificadas de *M. spathulata* R25L270.

### 12.5.1. Caracterização da atividade enzimática das frações frente a diferentes *p*-fenil ésteres de ácidos graxos

Os ensaios cinéticos com diferentes substratos com comprimentos de cadeia variáveis revelou que a enzima exibiu maior atividade frente ao pNPD, contendo dez carbonos, tanto para a fração purificada a partir da fração com 60% de sulfato de amônio, quanto de 80% (Figura 40).



**Figura 40 - Atividade relativa para diferentes *p*-fenil ésteres de ácidos graxos das frações purificadas a partir do extrato de 60% (azul) e 80% (vermelho) de saturação por sulfato de amônio.** pNPD - 4-nitrofenil decanoato, pNPM - 4-nitrofenil miristato, pNPP - 4-nitrofenil palmitato. Ensaio feito em triplicata.

As frações apresentaram um comportamento geral similar para os diferentes substratos, porém a fração purificada a partir de 80% de saturação mostrou uma atividade inferior para a cadeia de extensão intermediária pNPM 48% frente aos 63% da fração de 60% de saturação e um pouco maior para a cadeia de maior extensão de carbonos pNPP 70% frente 65% da fração de 60% de saturação. Este dado sugere a existência de diferentes lipases nas frações de 60 e 80% de saturação de sulfato de amônio. Cada uma com afinidades diferenciadas para com substratos de diferentes comprimentos de cadeia carbônica em relação à outra.

Percebe-se grande variação das especificidades das enzimas lipases frente a substratos com diferentes comprimentos de cadeias carbônicas (Sharma et al., 2001). As lipases de *Geotrichum* sp. SYBC WU-3 e *Acinetobacter baumannii* BD5 é também apresentaram especificidades distintas para diferentes *p*-nitrofenil ésteres, muito



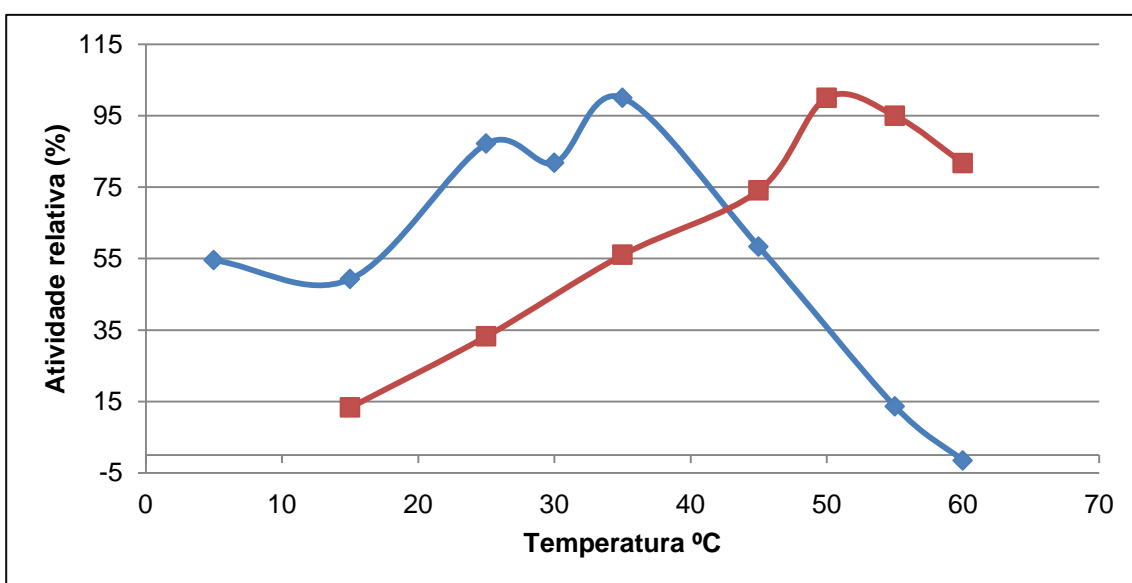
embora os resultados ótimos também foram encontrados para o reagente de mesmo comprimento de cadeia carbônica – C4 (Cai, et al., 2009, Park, et al., 2009), assim como foi observado para os dados da Figura 40. As lipases de *Bacillus subtilis* 168 apresentou maior atividade frente a substratos p-nitrofenil de cadeia carbônica com oito carbonos (C8) (Lesuisse et al., 1993)

A lipase de *Bacillus thermoleovorans* ID-1 (Lee, et al., 1999) apresentou maior atividade para o p-fenil caproato (C6), seguido do decanoato (C10), o substrato de maior atividade para os pools de atividade purificados a partir das frações de 60% e 80% de saturação de *Moniliella spathulata* (Figura 40). A lipase de *Pseudomonas* sp. 7323 (Zhang & Zeng, 2008) exibiu preferência para o p-fenil decanoato (C10).

### 12.5.2. Caracterização da atividade enzimática das frações frente a diferentes temperaturas

As frações purificadas a partir daquelas obtidas em 60 e 80% de saturação exibiram temperaturas de ótimo de atividade bastante diferentes. A fração de saturação de 60% purificada exibiu dois ótimos de atividade nas temperaturas de 25°C e 35°C. A fração de saturação de 80%, por outro lado, apresentou ótimo de atividade para a temperatura de 50°C, sugerindo a existência de diferentes enzimas produzidas por *M. spathulata* R25L270 (Figura 41).

O perfil das atividades da fração de 60% sugeriu existir duas enzimas nessa fração de saturação já que o comportamento da caracterização dessa amostra exibiu



**Figura 41 - Atividade relativa para diferentes temperaturas das frações purificadas a partir do extrato de 60% (azul) e 80% (vermelho) de saturação por sulfato de amônio. Em vermelho e azul, respectivamente, as frações purificadas à partir do pool de 80 % e 60 % de saturação. Ensaio feito em duplicata.**

dois máximos de temperatura. Levando-se em consideração o resultado alcançado com o teste da fração purificada a partir do extrato de 80% de saturação, julgou-se possível a existência de três distintas lipases produzidas por *Moniliella spathulatha* R25L270 (Figura 41).

A lipase de *Pseudomonas aeruginosa* (MTCC 2488) (Chouhan, 2010) apresentou maior atividade na temperatura de 35°C, valor similar encontrado para a lipase de *Cryptococcus sp.* (Kamini, et al, 2000) e *Serratia marcescens* (Abdou, 2003) com 37°C para atividade ótima. Também a temperatura de 30°C foi encontrada com ótima para lipases de *Pseudomonas sp.* 7323 (Zhang, et al., 2008), *Psychrobacter sp.* 7195 (Zhang, et al., 2008). Ótimos de atividade em 25°C foram encontrados para lipases de *Photobacterium lipolyticum* M37 (Jeon, et al., 2009) e de lipase de metagenoma de sedimentos de mares profundos (Ryu, et al., 2006). Todos esses resultados aproximam-se com os valores encontrados para a(s) lipase(s) contida(s) na fração de 60% de saturação já que foram observados picos de atividade em 25°C e 35°C (Figura 41).

A lipase JkP01 de metagenômica (Sharma, et al., 2012) apresentou ótimo de atividade a 50°C, no mesmo valor encontrado na caracterização do pool de atividade obtido do extrato de 80% de saturação (Figura 41). Valores próximos ao encontrado para o pool de atividade (80% de saturação) de *M. spathulata* foi notado para lipase P1 de *Bacillus stearothermophilus* (Sinhaikul, et. al., 2001), uma vez que o ótimo de atividade para essa enzima foi encontrada em 55°C.

Além disso, para as lipases de *Geotrichum sp.* SYBC WU-3 foram encontrados os valores de 15°C (lipase B) e 20°C (lipase A), indicando que mesmo que diferentes lipases sejam secretadas pelo mesmo microrganismo, elas podem ter temperaturas ótimas distintas (Cai, et al., 2009).

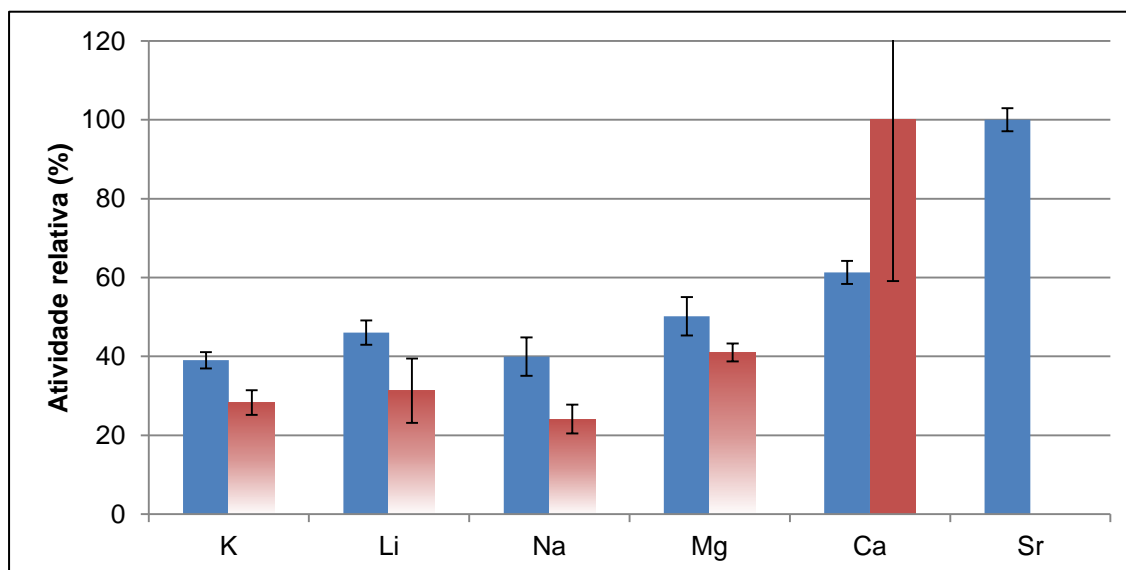
Percebeu-se por esses resultados que a técnica de separação por precipitação de sulfato de amônio foi bastante efetiva para separar das dois extratos que apresentaram comportamentos bastante distintos quanto ao ótimo de atividade. Caso contrário, seria observado na caracterização nas suas frações purificadas um pico com atividade na mesma região da outra fração, evidenciando a contaminação das lipases delas e a ineficiência da técnica para separar essas enzimas em uma única etapa.

### 12.5.3. Caracterização da atividade enzimática das frações frente a diferentes cátions

A fração purificada a partir do extrato de 60% apresentou o estrôncio como o íon de maior efeito de ativação para essa fração. Em contrapartida, o teste para a outra fração de 80% revelou que o estrôncio, que ocasionava a melhor atividade para a fração de 60%, precipitava a amostra de 80% (Figura 42).

Também, percebeu-se que a diferença entre o resultado do tratamento do cátion que proporcionou maior atividade em relação aos efeitos dos demais cátions para a fração de 60% foi muito menor do que para 80%. Na representação gráfica, os resultados para os tratamentos de  $K^+$ ,  $Li^+$ ,  $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$ , foram aumentados 10x para permitir comparação entre os dois grupos (Figura 42).

Esses resultados reforçam os indicativos de que as lipases de cada uma das frações realmente eram distintas. Percebeu-se muito grande diferença na interferência dos íons sobre a cinética da lipase comparando os dois grupos. A lipase obtida da fração de 60% de saturação foi mais ativada com a presença de estrôncio do que com os outros íons (Figura 42). O valor médio de aumento foi de 47,3% do estrôncio em relação aos efeitos dos demais íons.



**Figura 42 - Atividade relativa para diferentes cátions das frações purificadas a partir do extrato de 60% (azul) e 80% (vermelho) de saturação por sulfato de amônio.** As colunas com coloração em gradiente tiveram seus resultados aumentados 10x para facilitar a comparação de efeitos entre essas frações e as análogas a 60 % de saturação. O resultado para o estrôncio com a amostra de 80% ocasionou a precipitação da proteína, ocasionando na ausência desse resultado. Os resultados foram obtidos em triplicata.

A fração protéica purificada a partir da amostra de 80% de saturação precipitou-se na presença dos íons estrôncio em solução (Figura 42). O resultado de precipitação da fração de 80% por sua vez pode ser bastante importante em termos industriais visto que a enzima dessa fração poderia ser rapidamente isolada de um sistema químico mais complexo quando aplicada uma concentração de um sal de estrôncio, resultando em um extrato purificado com bastante eficiência.

O melhor resultado para atividade na presença de íons foi obtido para o cálcio para a fração purificada do extrato de 80%. Além disso, cabe ressaltar a grande diferença observada entre a atividade do tratamento com cálcio em relação aos outros grupos cujos valores desses tratamentos foram menos eficientes estiveram na ordem de grandeza dez vezes inferior ao maior grupo (Figura 42). Também, observou-se que os melhores resultados para ambos os grupos foram obtidos para cátions divalentes e que, dentre eles, quanto maior era o raio atômico do cátion, melhores os resultados na atividade, exceto para o estrôncio na fração de 80%.

Percebeu-se também que os resultados para os grupos  $K^+$ ,  $Li^+$ ,  $Na^+$  e  $Mg^{2+}$ , embora não tivessem fornecido influências maiores na atividade enzimática para os dois extratos de saturação, tratamentos para os dois extratos apresentaram comportamento similar entre si. Em conjunto então, pode-se inferir que existem porções das lipases dos extratos com diferenças estruturais que acarretam em uma resposta muito diferente frente aos íons  $Ca^{2+}$  e  $Sr^{2+}$  que mais influenciam positivamente na sua atividade em relação aos demais. Outras regiões da molécula responsáveis pela ligação os esses íons  $K^+$ ,  $Li^+$ ,  $Na^+$  e  $Mg^{2+}$  poderiam ser bastante similares entre si (Figura 42).

Percebeu-se também que a atividade relativa média da fração de 60% foi 33,59% maior do que da fração de 80% de saturação, para todos os íons testados. Isso demonstra que a enzima dessa fração de saturação teria condição de atuar em sistemas químicos mais complexos em termos desses íons, tendo condição de manter uma taxa de conversão mais estável (Figura 42).

Os resultados observados nesse experimento se distanciam daqueles reportados por Sharma et al., 2001, visto que a maioria dos trabalhos citados apontam o íon  $Mg^{2+}$  como aquele de maior ocorrência na ativação de lipases. Muito embora percebeu-se que os íons que forneceram os melhores resultados sobre a atividade de cada pool em cada fração de saturação,  $Ca^{2+}$  e  $Sr^{2+}$  (Figura 42) eram divalentes, tão bem como os principais íons ativadores de lipase em trabalhos reunidos por Sharma et al., 2001,  $Mg^{2+}$  e  $Ca^{2+}$ .

A lipase de *Pseudomonas aeruginosa* (MTCC 2488) apresentou maior atividade para íons cálcio, bem como observado para a fração de 80% de saturação (Chouhan, 2010). Isso também foi observado para as lipases microbianas de *Bacillus thermoleovorans* ID-1 (Lee, et al., 1999); *Acinetobacter baumannii* BD5 (Park, et al., 2009); *Pseudomonas* sp. 7323 (Zhang & Zeng, 2008) e *Aspergillus terreus* (Yadav et al., 1998).

A ativação de lipases mediada por estrôncio já foi reportada para lipases que exibem aparente preferência por íons divalentes. A lipase de *Staphylococcus hyicus* exibiu ativação por estrôncio e cálcio (Van Oort, 1989). A lipase de *Staphylococcus aureus* teve retenção completa de sua atividade quando os íons cálcio junto à enzima foram substituídos por estrôncio ou bário (Simons, et al., 1996).

A precipitação de proteínas mediada por estrôncio não aparece nos trabalhos reportados por Hasan et al., 2012, ainda que já tenha sido descrita na literatura para precipitar a fosfoproteína da dentina (Kuboki et al., 1979). Os autores desse trabalho propuseram o isolamento desta proteína baseado nesta propriedade e esta estratégia poderia ser usada para purificar a lipase da fração 80% de saturação.

#### **12.5.4. Caracterização da atividade enzimática das frações frente a diferentes valores de pH**

Os resultados para pH revelaram que as frações purificadas a partir dos diferentes extratos de saturação possuíam diferentes ótimos de atividade. A fração de 60% apresentou um pH ótimo de atuação para o valor de 7,5 enquanto a fração de 80% indicou o valor de 9,0 (Figura 43).

Muito embora foram testados valores de pH até 10,3, percebeu-se que não foi possível observar atividade nesses valores visto que o reagente se hidrolisava espontaneamente. Sendo assim, o valor real de pH ótimo para a fração de 80% poderia possivelmente ser inclusive maior do que o encontrado (9,0).

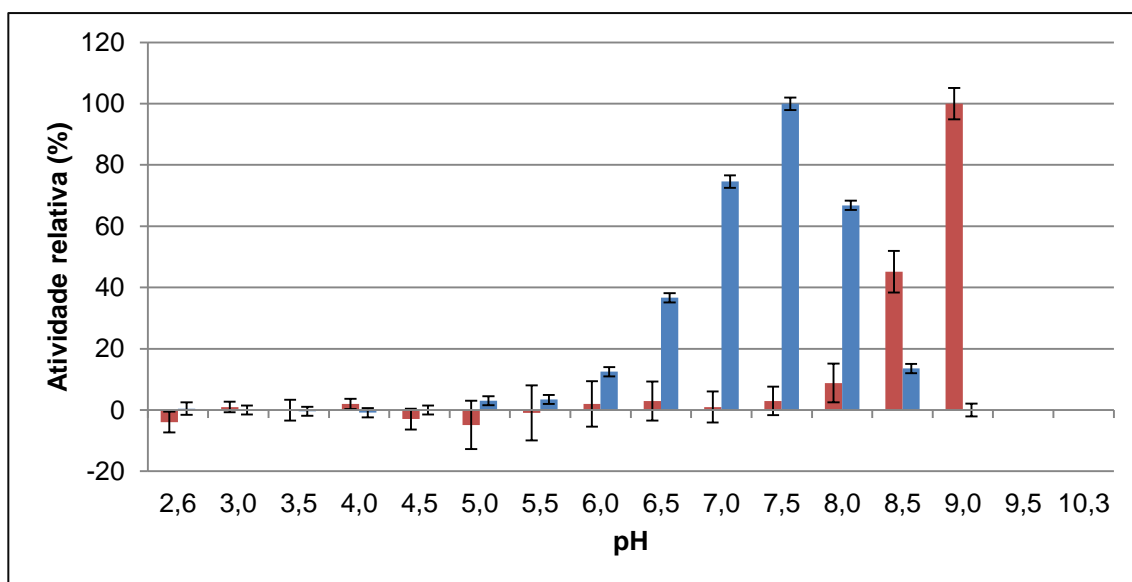
Os resultados de atividade de cada pool de saturação mostrou resultados de influência do pH na atividade enzimática fora de uma faixa média encontrada como ativadora de lipases pH 4,5 a 7,0 (Sharma et al., 2001), visto que os resultados de atividade dos pools de *M. spathulata* frente o pH mostraram que a fração advinda do pool de 60% de saturação por sulfato de amônio apresentou melhor atividade para o pH 7,5 e a fração de 80% para o pH 9,0 (Figura 43).

A purificação parcial da lipase de *P. aeruginosa* (MTCC 2488) revelou maior atividade da enzima para o pH 7,0 (Chouhan, 2010), bem como foi encontrado para a

enzima de *Cryptococcus sp.*S-2 (Kamini, et al., 2000). Para as lipases de *Rhizopus oryzae* (Hiol, et al., 2000), *Bacillus thermoleovorans* ID-1 (Lee, et al, 1999) e *Acinetobacter sp.* (Kasana, et al., 2008) a melhor atividade foi encontrada no valor de 7,5, valores próximos àqueles encontrados para a atividade frente ao pH partir do extrato de 60% de saturação de *M. spathulata* (Figura 43).

Por outro lado, o estudo para as lipases de *Geotrichum sp.* SYBC WU-3 (Cai, et al., 2009) e lipase L1 de *Bacillus stearothermophilus* (Kim, et al., 1998) revelou que para ambas o pH em que havia maior atividade foi o de 9,5. Esse valor coincide com o resultado encontrado no estudo da fração obtida do extrato de 80% de saturação de *M. spathulata*. O de pH de 9,0 foi o encontrado como o que proporcionava maior atividade para as lipases JkP01 (Sharma et al., 2012), de *Bacillus thermoleovorans* ID-1 (Lee, et al, 2001), de *Pseudomonas sp.* 7323 (Zhang, et al., 2008), *Psychrobacter sp.* 7195 (Zhang, et al., 2008) e *Serratia marcescens* (Abdou, 2003).

Esse resultado é mais um indício de existirem diferentes lipases produzidas por essa levedura devido cada fração ter apresentado um diferente pH. O resultado para pH reforçou a suposição de existir mais de uma enzima para a fração vinda do extrato de 60% de saturação visto que o resultado de atividades exibe um perfil mais alargado do que para a fração de 80%.



**Figura 43 - Atividade relativa para diferentes pH das frações purificadas a partir do extrato de 60% (azul) e 80% (vermelho) de saturação por sulfato de amônio.** Os valores de atividade para os pH 9,5 e 10,3 não aparecem pois o reagente sofria intensa hidrólise espontânea. Os ensaios foram feitos em triplicata.

## 5. Conclusões

Foi possível determinar uma formulação matemática que assegurava a independência das variáveis pH e concentração de fosfato no meio de cultura.

Foi possível encontrar as concentrações das variáveis que não precipitavam os meios de cultura através de testes de preparação dos mesmos, excluindo cloreto de cálcio e sulfato de magnésio dos meios.

A variável “fonte de nitrogênio [N]” foi a de menor contribuição para explicar a produção de lipase enquanto a fonte de nitrogênio nitrato de sódio e a fonte de carbono óleo de oliva foram as variáveis de maior contribuição para explicar a produção de lipase por *M. spathulatha* R25L270.

Para o sétimo dia de cultivo de *M. spathulatha* R25L270, nenhuma das variáveis afetam a densidade celular. Para o mesmo dia, a variável concentração da fonte de carbono influencia na dosagem proteica do meio de cultura. Nesse dia também a fonte de carbono e as fontes de nitrogênio sulfato de amônio e nitrato de sódio exercem influência na atividade normalizada do sobrenadante de cultivo.

Para o décimo primeiro dia de cultivo de *M. spathulatha* R25L270, o óleo de oliva causa a produção de emulsificantes ao contrário de glicerol. Para aquela fonte de carbono no mesmo dia, nenhuma das variáveis testadas explica a produção desse composto.

No quinto dia de cultivo de *M. spathulatha* R25L270 contendo peptona 0,1%, NaNO<sub>3</sub> 0,02% e fonte de carbono óleo de oliva, as variáveis pH e PO<sub>4</sub> exercem efeitos sobre a atividade enzimática, em que os mais elevados resultados são encontrados nos respectivos valores de 6,5 e 0,1%.

No quinto dia de cultivo de *M. spathulatha* R25L270 contendo peptona 0,1%, NaNO<sub>3</sub> 0,02% e fonte de carbono glicerol, as variáveis concentração da fonte de carbono “[C]”, pH, PO<sub>4</sub> e as interações de segunda e terceira ordem respectivamente [C]\*PO<sub>4</sub> e [C]\*pH\*PO<sub>4</sub> exercem efeitos sobre a atividade enzimática. Os mais elevados resultados de atividade são encontrados nos respectivos valores das variáveis de 9,0%, 6,5 e 0,1%.

A melhor metodologia para purificação parcial de lipases de *M. spathulatha* R25L270 consiste em precipitação com sulfato de amônio, ultrafiltração em membrana Amicon® de 30KDa e cromatografia de gel filtração em Superose12®.

As fontes de carbono (glicerol e óleo de oliva) presentes no meio de cultura de *Moniliella spathulata* R25L270 proporcionam diferenças no padrão de produção das enzimas dessa levedura, independente do extrato de saturação.

Os dados de caracterização dos pools de atividade de 60 e 80% em conjunto com os diferentes perfis cromatográficos obtidos a partir de cada extrato de saturação são fortes indícios de que *M. spathulata* R25L270 secreta no mínimo duas lipases, com aparente baixa tolerância à solventes orgânicos, distintas, de peso molecular aparente de 55-60kDa. Cada fração possuindo distintas especificidades de substratos, tão bem quanto diferentes requisitos de cátions, temperaturas e pH para serem atingidas suas atividades enzimáticas ótimas.



## 14. Perspectivas

Estudar a microbiologia de *M. spathulata* R25L270.

Encontrar os ótimos de produção de lipase por *M. spathulata* R25L270 através de outras técnicas de otimização, por exemplo, um deslocamento ascendente, seguido de um delineamento composto central ou metodologia de Box-Benhken.

Clonar e expressar os genes de lipase de *Moniliella spathulata* R25L270 com cauda de histidina para facilitar a produção em alta escala e purificação da mesma.

Purificar até a homogeneidade e caracterizar todas as lipases de *Moniliella spathulata* R25L270.

Fazer ensaios de purificação parcial da enzima referente à fração isolada a 80% de saturação empregando sais de estrôncio para seu isolamento.

Fazer ensaios de caracterização das diferentes lipases frente a solventes orgânicos com concentrações gradativas dos mesmos utilizando de um planejamento experimental a fim de se reduzir a quantidade de testes para ser verificada a melhor condição de estabilidade.

Desenvolver um vetor de expressão de lipase que consiga tanto utilizar de glicerol como fonte de carbono quanto exportar uma enzima clonada para o meio extracelular a fim de utilizar o resíduo da indústria de biodiesel em larga escala e reduzir o custo de produção da lipase microbiana.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abada, E. A. E.-M. (2008). Production and characterization of a mesophilic lipase isolated from *Bacillus stearothermophilus* AB-1. *Pakistan journal of biological sciences PJBS*, 11(8), 1100-1106. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18819547>
- Abdou, A. M. (2003). Purification and partial characterization of psychrotrophic *Serratia marcescens* lipase. *Journal of Dairy Science*, 86(1), 127-132. Am Dairy Sci Assoc. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12613856>
- Açikel, Ü., Erşan, M., & Sağ Açikel, Y. (2010). Optimization of critical medium components using response surface methodology for lipase production by *Rhizopus delemar*. *Food and Bioproducts Processing*, 88(1), 31-39. doi:10.1016/j.fbp.2009.08.003
- Agarwal, A. K. (2007). Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines. *Progress in Energy and Combustion Science*, 33(3), 233–271. doi:10.1016/j.pecs.2006.08.003
- Arakawa, T., & Timasheff, S. N. (1984). Mechanism of protein salting in and salting out by divalent cation salts: balance between hydration and salt binding. *Biochemistry*, 23(25), 5912–23. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6525340>
- Babcock, R., Clausen, E., & Popp, M. (2008). Yield characteristics of biodiesel produced from chicken fat-tall oil blended feedstocks. Retrieved from <http://trid.trb.org/view.aspx?id=850767>
- Balat, M., & Balat, H. (2008). A critical review of bio–diesel as a vehicular fuel. *Energy Conversion and Management*, 49(10), 2727–2741. Elsevier. DOI: 10.1016/j.enconman.2008.03.016
- Bandmann, N.; Collet, E.; Leijen, J.; Uhlén, M.; Veide, A.; Nygren, P.A., (2000). Genetic Engineering of *Fusarium solani* pisi lipase cutinase for enhanced partitioning in PEG–phosphate aqueous two phase systems. *Journal of biotechnology* 79 (161–172, 2000.
- Barros Neto, B.; Scarminio, I. S.; Bruns, R. E. (2003) Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Campinas: EDUNICAMP, 2ª ed. 393p.
- Barros, R. de C. (2010). *Relatório: Energias Renováveis Levantamento do Estado da Arte da Pesquisa em Energias Renováveis no Estado de Minas Gerais na área de Bioenergia* (pp. 0–37).
- Bon et al., (2008). Lipases em biocatálise in *Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado*. Interciência: UFRJ:CAPES:FAPERJ:FCT., Rio de Janeiro.
- Box, George E. P., Hunter S., Hunter, W.G. (2005) *Statistics for Experimenters: design, discovery and innovation*, Wiley Interscience.

- Box, George (1992). Sequential Experimentation and Sequential Assembly of Designs. *Quality Engineering*, 2(5), 321–330. Retrieved in <http://cqpi.engr.wisc.edu/system/files/r083.pdf>
- Cai, Y., Wang, L., Liao, X., Ding, Y., & Sun, J. (2009). Purification and partial characterization of two new cold-adapted lipases from mesophilic *Geotrichum* sp. SYBC WU-3. *Process Biochemistry*, 44(7), 786–790. doi:10.1016/j.procbio.2009.03.011
- Chennupati, S., Potumarthi, R., Gopal Rao, M., Manga, P. L., Sridevi, M., & Jetty, A. (2009). Multiple responses optimization and modeling of lipase production by *Rhodotorula mucilaginosa* MTCC-8737 using response surface methodology. *Applied biochemistry and biotechnology*, 159(2), 317–29. doi:10.1007/s12010-009-8547-6
- Chouhan, M. (2010). Partial purification, characterization of lipase produced from *P. aeruginosa*. *Asiatic Journal of Biotechnology Resources*, 01, 29-34. Retrieved from [http://pacificjournals.com/ajbor/pdf/06-2010/short\\_communication/29-34.pdf](http://pacificjournals.com/ajbor/pdf/06-2010/short_communication/29-34.pdf)
- Cochran, W. G., Cox, G. M., Experimental designs. John Wiley & Sons inc. New York, 1957.
- Colen, G., Junqueira, R. G., & Moraes-Santos, T. (2006). Isolation and Screening of Alkaline Lipase-producing Fungi from Brazilian Savanna Soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(8), 881–885. doi:10.1007/s11274-005-9118-9
- Contesini, F. J., da Silva, V. C. F., Maciel, R. F., de Lima, R. J., Barros, F. F. C., & de Oliveira Carvalho, P. (2009). Response surface analysis for the production of an enantioselective lipase from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)*, 47(5), 563–71. doi:10.1007/s12275-008-0279-8
- Coombs, A. (2007). Glycerin bioprocessing goes green. *Nature biotechnology*, 25(9), 953–4. doi:10.1038/nbt0907-953
- Cox, P. M., Betts, R. A., Jones, C. D., Spall, S. A., & Totterdell, I. J. (2000). Acceleration of global warming due to carbon-cycle feedbacks in a coupled climate model. *Nature*, 408(6809), 184–187. Nature Publishing Group. Retrieved from [http://www.nature.com/cgi-taf/DynaPage.taf?file=/nature/journal/v408/n6809/abs/408184a0\\_fs.html&dynoptions=doi1100610730](http://www.nature.com/cgi-taf/DynaPage.taf?file=/nature/journal/v408/n6809/abs/408184a0_fs.html&dynoptions=doi1100610730)
- Crous, P. W., Gams, W., Stalpers, J. A., Robert, V., Stegehuis, G., Schimmelcultures, C., Box, P. O. et al. (2004). MycoBank : an online initiative to launch mycology into the 21st century. *Studies in Mycology*, 50, 19–22 em <http://www.mycobank.org/MycoTaxo.aspx?Link=T&Rec=324998> acessado em 25/02/2012
- Dias, R. P., (2010) DISSERTAÇÃO. Produção microbiana de biossurfactantes e lipases a partir do glicerol, subproduto do biodiesel. Universidade Federal de

Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

- Ebrahimpour, A., Abd Rahman, R. N. Z. R., Ean Ch'ng, D. H., Basri, M., & Salleh, A. B. (2008). A modeling study by response surface methodology and artificial neural network on culture parameters optimization for thermostable lipase production from a newly isolated thermophilic *Geobacillus* sp. strain ARM. *BMC biotechnology*, 8, 96. doi:10.1186/1472-6750-8-96
- Ericsson, D. J., Kasrayan, A., Johansson, P., Bergfors, T., Sandström, A. G., Bäckvall, J.-E., & Mowbray, S. L. (2008). X-ray structure of *Candida antarctica* lipase A shows a novel lid structure and a likely mode of interfacial activation. *Journal of molecular biology*, 376(1), 109–19. doi:10.1016/j.jmb.2007.10.079
- Farooqui, A. A., Yang, H. C., & Horrocks, L. A. (1994). Purification of lipases, phospholipases and kinases by heparin–Sepharose chromatography. *Journal of chromatography. A*, 673(2), 149–58. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8055107>
- Feldmann, H. (2005). Yeast Molecular Biology – A Short Compendium on Basic Features and Novel Aspects. Retrieved from [http://biochemie.web.med.uni-muenchen.de/Yeast\\_Biol/](http://biochemie.web.med.uni-muenchen.de/Yeast_Biol/)
- Felicio, R. A., & Onça, D. D. S. (2010). “ aquecimento global ”, “ mudanças climáticas ” e “ caos ambiental ” justificando o falso “ desenvolvimento sustentável ”: a teoria da tríade. Fórum ambiental da alta paulista, VI, 569-590. Retrieved from <http://www.sinsantiago.com.br/material/mc-c-2.pdf>
- Fiametti, K. G., Sychoski, M. M., De Cesaro, A., Furigo, A., Bretanha, L. C., Pereira, C. M. P., Treichel, H. et al. (2011). Ultrasound irradiation promoted efficient solvent-free lipase-catalyzed production of mono- and diacylglycerols from olive oil. *Ultrasonics sonochemistry*, 18(5), 981–7. Elsevier B.V. doi:10.1016/j.ultsonch.2010.11.010
- Fjerbaek, L., Christensen, K. V., & Norddahl, B. (2009). A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. *Biotechnology and bioengineering*, 102(5), 1298–315. doi:10.1002/bit.22256
- Fregolente, P. B. L., Fregolente, L. V., Maciel, M. R. W., & Carvalho, P. O. (2009). Screening of Microbial Lipases and Evaluation of Their Potential to produce Glycerides with High Gamma Linolenic Acid Concentration. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(4), 747–756. doi:10.1590/S1517-83822009000400004
- Fukuda, H., Kondo, A., & Noda, H. (2001). Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92(5), 405–16. Elsevier. doi:10.1016/S1389-1723(01)80288-7

- Gooding, K. M. (2004). Ion Exchange: Mechanism and Factors Affecting Separation. *Encyclopedia of chromatography* (p. 1679). doi:10.1081/E-ECHR
- Grochulski, P. Li, Y. Schrag, J. D. Cygler, M. (1994) Two conformational states of *Candida rugosa* lipase. *Protein Science* 3 (1) p. 82-91. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11084600>
- Gupta, N., Mehra, G. & Gupta, R. (2004). A glycerol-inducible thermostable lipase from *Bacillus* sp.: medium optimization by a Plackett–Burman design and by response surface methodology *Canadian Journal of Microbiology*, 50:361-368, 10.1139/w04-022
- Gupta, N., Sahai, V., & Gupta, R. (2007). Alkaline lipase from a novel strain *Burkholderia multivorans*: Statistical medium optimization and production in a bioreactor. *Process Biochemistry*, 42(4), 518–526. doi:10.1016/j.procbio.2006.10.006
- Hasan, F., Shah, A. A., & Hameed, A. (2009). Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. *Biotechnology advances*, 27(6), 782–98. Elsevier Inc. doi:10.1016/j.biotechadv.2009.06.001
- Hasseine, A., Meniai, A.–H., & Korichi, M. (2009). Salting–out effect of single salts NaCl and KCl on the LLE of the systems (water + toluene + acetone), (water + cyclohexane + 2–propanol) and (water + xylene + methanol). *Desalination*, 242(1–3), 264–276. Elsevier B.V. doi:10.1016/j.desal.2008.05.006
- He, Y.-Q., & Tan, T.-W. (2006). Use of response surface methodology to optimize culture medium for production of lipase with *Candida* sp. 99-125. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 43(1-4), 9-14. doi:10.1016/j.molcatb.2006.02.018
- Healthcare, GE. (2006). GE Healthcare. *Media*. Retrieved from [http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/C313AE81D8100A40C1257628001CCDF9/\\$file/56790700AF.pdf](http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/C313AE81D8100A40C1257628001CCDF9/$file/56790700AF.pdf)
- Hedrich, H., Isobe, K., Stahl, B., Nokihara, K., Kordel, M., Schmid, R. ., Karas, M. et al. (1993). Matrix–assisted ultraviolet laser desorption/ionization mass spectrometry applied to multiple forms of lipases. *Analytical Biochemistry*, 211(2), 258–292. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269783712716>
- Heravi, K., Eftekhar, F., Yakhchali, B., & Tabandeh, F. (2008). Isolation and identification of a lipase producing *Bacillus* sp. from soil. *Pakistan journal of Biological Sciences*, 11(5), 740–745. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18819570>
- Hiol, A., Jonzo, M., Rugani, N., Druet, D., Sarda, L., & Comeau, L. (2000). Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus*

- oryzae strain isolated from palm fruit. *Enzyme and microbial technology*, 26(5–6), 421–430. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10713217>
- Hoog, G.S. de (1979). Taxonomic review of Moniliella, Trichosporonoides and Hyalodendron. *Studies in Mycology*. 19, 1–36.
- Hou, C. T. (1997). Characterization of new yeast lipases. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74(11), 1391–1394. Springer. Retrieved from <http://www.springerlink.com/index/8402273186708W31.pdf>
- Iftikhar, T., Niaz, M., Jabeen, R., & Haq, I. U. (2011). Purification and Characterization of Extracellular Lipases. *Pakistan Journal of Botany*, 43(3), 1541–1545. Retrieved from [http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/43\(3\)/PJB43\(3\)1541.pdf](http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/43(3)/PJB43(3)1541.pdf)
- IPCC (2007). Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change – Core Writing Team, Pachauri, R.K. and Reisinger, A. (Eds.) IPCC, Geneva, Switzerland. pp 104. [http://www.ipcc.ch/publications\\_and\\_data/publications\\_ipcc\\_fourth\\_assessment\\_report\\_synthesis\\_report.htm](http://www.ipcc.ch/publications_and_data/publications_ipcc_fourth_assessment_report_synthesis_report.htm)
- IPCC (1995). Second Assessment Climate Change 1995. Retrieved from <http://www.ipcc.ch/pdf/climate-changes-1995/ipcc-2nd-assessment/2nd-assessment-en.pdf>
- Jaeger, K.-E., & Eggert, T. (2002). Lipases for biotechnology. *Current opinion in biotechnology*, 13(4), 390–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12323363>
- Jeffrey, C. (2007). Phosphate Buffer Calculator. 4. Retrieved from <http://home.fuse.net/clymer/buffers/phos2.html>
- Jeon, J. H., Kim, J.-T., Kim, Y. J., Kim, H.-K., Lee, H. S., Kang, S. G., Kim, S.-J., et al. (2009). Cloning and characterization of a new cold-active lipase from a deep-sea sediment metagenome. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(5), 865-874. {SPRINGER}. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18773201>
- Jones, D., Watkins, A., Braganza, K., & Coughlan, M. (2007). The Great Global Warming Swindle: a Critique. *Bulletin of Australian Meteorological and Oceanographic Society*, 20(3), 63–72. Retrieved from [http://nsw-rp-42.csiro.au/en/Outcomes/Climate/Understanding~/media/CSIROau/Divisions/CSIRO Marine Atmospheric Research/GGWS\\_CMAR\\_PDF Standard.pdf](http://nsw-rp-42.csiro.au/en/Outcomes/Climate/Understanding~/media/CSIROau/Divisions/CSIRO Marine Atmospheric Research/GGWS_CMAR_PDF Standard.pdf)
- Joseph, B., Shrivastava, N., & Ramteke, P. W. (2012). Extracellular cold-active lipase of *Microbacterium luteolum* isolated from Gangotri glacier, western Himalaya: Isolation, partial purification and characterization. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. Academy of Scientific Research and Technology. doi:10.1016/j.jgeb.2012.02.001

- Kalil, S. J., Maugeri, F., & Rodrigues, M. I. (2000). Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization. *Process Biochemistry*, 35(6), 539–550. doi:10.1016/S0032–9592(99)00101–6
- Kamini, N. ., Fujii, T., Kurosu, T., & Iefuji, H. (2000). Production, purification and characterization of an extracellular lipase from the yeast, *Cryptococcus* sp. S–2. *Process Biochemistry*, 36(4), 317–324. doi:10.1016/S0032–9592(00)00228–4
- Kanwar, L., Gogoi, B. K., & Goswami, P. (2002). Production of a *Pseudomonas* lipase in n-alkane substrate and its isolation using an improved ammonium sulfate precipitation technique. *Bioresource technology*, 84(3), 207–11. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12118695>
- Kerr, R. (2006). Politicians Attack, But Evidence for Global Warming Doesn't Wilt. *Science*, 313(July), 2006. Retrieved from <http://www.sciencemag.org/content/313/5786/421.short>
- Kasana RC, Kaur B, Yadav SK. (2008). Isolation and identification of a psychrotrophic *Acinetobacter* sp. CR9 and characterization of its alkaline lipase. *Journal of Basic Microbiology*; 48:207–12.
- Khoramnia, A., Ebrahimpour, A., Beh, B. K., & Lai, O. M. (2011). Production of a solvent, detergent, and thermotolerant lipase by a newly isolated *Acinetobacter* sp. in submerged and solid–state fermentations. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2011, 702179. doi:10.1155/2011/702179
- Kim, H.K., Park, S.Y., Lee, J.K., Oh, T.K. (1998) Gene cloning and characterization of thermostable lipase from *Bacillus stearo-thermophilus* L1. *Biosci Biotechnol Biochem* 62:66–71
- Korbekandi, H., Abedi, D., Pourhossein, M., Motovali–Bashi, M., Hejazi, M., Narimousasei, M., & Kabiri, M. (2008). Optimisation of *Candida rugosa* lipase esterase activity. *Asian Network for Scientific Information*, 7(1), 112/117. Retrieved from <http://en.scientificcommons.org/38867747>
- Kuboki, Y., Fujisawa, R., Aoyama, K., & Sasaki, S. (1979). Calcium-specific precipitation of dentin phosphoprotein: a new method of purification and the significance for the mechanism of calcification. *Journal of Dental Research*, 58(9), 1926–1932.
- Kumar, R., Mahajan, S., Kumar, A., & Singh, D. (2011). Identification of variables and value optimization for optimum lipase production by *Bacillus pumilus* RK31 using statistical methodology. *New biotechnology*, 28(1), 65–71. Elsevier B.V. doi:10.1016/j.nbt.2010.06.007
- Labbe, S., Larouche, L., Mailhot, D., & Séguin, C. (1993). Purification of Mouse MEP–1, a Nuclear Protein Which Binds to the Metal Regulatory Elements of Genes Encoding Metallothionein. *Nucleic Acid Research*, 21(7), 1549–1554.



- Lam, M. K., Lee, K. T., Mohamed, A. R. (2010). Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: a review. *Biotechnology Advances* 28 (4) p. 500–518. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.03.002
- Lee, D., Koh, Y., Kim, K., Kim, B., Choi, H., Kim, D., Suhartono, M. T., et al. (1999). Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *FEMS Microbiology Letters*, 179(2), 393-400. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10518742>
- Lee, J.-S., & Saka, S. (2010). Biodiesel production by heterogeneous catalysts and supercritical technologies. *Bioresource technology*, 101(19), 7191–200. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.biortech.2010.04.071
- Lee, S.-C., & Whitaker, J. R. (2004). Are molecular weights of proteins determined by superose 12 column chromatography correct? *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(16), 4948–52. doi:10.1021/jf0304932
- Leonov, S. L., (2010). Screening for novel cold-active lipases from wild type bacteria isolates. *Innovative Romanian Food Biotechnology*, 6, 12–17. Retrieved from [http://bioaliment.ugal.ro/revista/6/Paper 62.pdf](http://bioaliment.ugal.ro/revista/6/Paper%2062.pdf)
- Lesuisse, E., Schanck, K., & Colson, C. (1993). Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme. *The Federation of European Biochemical Societies Journal*, 216(1), 155-160. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8396026>
- Leung, D. Y. C., Wu, X., & Leung, M. K. H. (2010). A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. *Applied Energy*, 87(4), 1083–1095. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.apenergy.2009.10.006
- Lu, D., Yang, C., & Liu, Z. (2012). How hydrophobicity and the glycosylation site of glycans affect protein folding and stability: a molecular dynamics simulation. *The journal of physical chemistry. B*, 116(1), 390–400. doi:10.1021/jp203926r
- Mank, M., Stahl, B., & Boehm, G. (2004). 2,5-Dihydroxybenzoic acid butylamine and other ionic liquid matrixes for enhanced MALDI-MS analysis of biomolecules. *Analytical chemistry*, 76(10), 2938–50. doi:10.1021/ac030354j
- Marini, G. (2011). (Dissertação) *Avaliação por Planejamento de Experimentos dos Efeitos da Composição do Meio de Cultura e das Variáveis de Indução na Expressão de Pneumolisina de Streptococcus pneumoniae em Escherichia coli*. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Retrieved from [http://objdig.ufrj.br/60/teses/coppe\\_m/GuilhermoMarini.pdf](http://objdig.ufrj.br/60/teses/coppe_m/GuilhermoMarini.pdf)
- Mei, S., Yang, J., Ferreira, J. M. F., & Martins, R. (2002). Optimisation of parameters for aqueous tape-casting of cordierite-based glass ceramics by Taguchi method.



*Materials Science and Engineering: A*, 334(1–2), 11–18. doi:10.1016/S0921–5093(01)01773–7

- Meier, R., Drepper, T., Svensson, V., Jaeger, K.–E., & Baumann, U. (2007). A calcium–gated lid and a large beta–roll sandwich are revealed by the crystal structure of extracellular lipase from *Serratia marcescens*. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(43), 31477–83. doi:10.1074/jbc.M704942200
- Montgomery, D. (1991). *Introduction to statistical quality of control*. John Wiley & Sons, inc, New York.
- Mota, C. J. A., Silva, C. X. A., & Gonçalves, V. I. C. (2009). Gliceroquímica: Novos produtos e processos a partir da glicerona de produção de biodiesel. *Quim. Nova*, 32(3), 639–648. Retrieved from <http://www.scielo.br/pdf/qn/v32n3/a08v32n3.pdf>
- Mozaffar, Z., Weete, J.D., 1993. Purification and properties of an extracellular lipase from *Pythium ultimum*. *Lipids* 28, 377–382.
- Naik, S. N., Goud, V. V., Rout, P. K., & Dalai, A. K. (2010). Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2), 578–597. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.rser.2009.10.003
- Narasimharao, K., Lee, A., & Wilson, K. (2007). Catalysts in production of biodiesel: a review. *Journal of biobased materials and bioenergy*, 1(1), 19–30. American Scientific Publishers. doi:10.1166/jbmb.2007.002
- Neto, B. de B., Scarminio, I. S., & Bruns, R. E. (2003). *Como fazer experimentos – Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria* (2ª ed., p. 394). Campinas, SP: Editora da Unicamp.
- Nie, K., Xie, F., Wang, F., & Tan, T. (2006). Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: Optimization of the biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 43(1–4), 142–147. doi:10.1016/j.molcatb.2006.07.016
- NIST/SEMATECH (2003). e–Handbook of Statistical Methods, em: <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/>, 14/02/2012
- Oliveira, LS; Franca, A. (2009). From solid biowastes to liquid biofuels. *Agricultural wastes, Nova Science*, 25. [http://www.demec.ufmg.br/disciplinas/eng032-BL/solid\\_biowastes\\_liquid\\_biofuels.pdf](http://www.demec.ufmg.br/disciplinas/eng032-BL/solid_biowastes_liquid_biofuels.pdf) em 03/03/2012
- Park, I.-H., Kim, S.-H., Lee, Y.-S., Lee, S.-C., Zhou, Y., Kim, C.-M., Ahn, S.-C., et al. (2009). Gene cloning, purification, and characterization of a cold-adapted lipase produced by *Acinetobacter baumannii* BD5. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(2), 128-135.

- Peattie, K., & Crane, A. (2005). Green marketing: legend, myth, farce or prophesy? *Qualitative Market Research: An International Journal*, 8(4), 357–370. doi:10.1108/13522750510619733
- Pinholt, C., Fanø, M., Wiberg, C., Hostrup, S., Bukrinsky, J. T., Frokjaer, S., Norde, W. et al. (2010). Influence of glycosylation on the adsorption of *Thermomyces lanuginosus* lipase to hydrophobic and hydrophilic surfaces. *European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 40(4), 273–81. doi:10.1016/j.ejps.2010.03.021
- Queiroz, J. a, Tomaz, C. T., & Cabral, J. M. (2001). Hydrophobic interaction chromatography of proteins. *Journal of biotechnology*, 87(2), 143–59. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11278038>
- Rahmat, N., Abdullah, A. Z., & Mohamed, A. R. (2010). Recent progress on innovative and potential technologies for glycerol transformation into fuel additives: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(3), 987–1000. doi:10.1016/j.rser.2009.11.010
- RCEP. (2004). Biomass as a Renewable Energy Source. London: Royal Commission on Environmental Pollution. Retrieved from [http://www.biomassenergycentre.org.uk/pls/portal/docs/PAGE/RESOURCES/REF\\_LIB\\_RES/PUBLICATIONS/RCEP\\_BIOMASS\\_REPORT.PDF](http://www.biomassenergycentre.org.uk/pls/portal/docs/PAGE/RESOURCES/REF_LIB_RES/PUBLICATIONS/RCEP_BIOMASS_REPORT.PDF)
- Reetz, M. T. (2002). Lipases as practical biocatalysts. *Current opinion in chemical biology*, 6(2), 145-50. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12038997>
- Reis, P., Holmberg, K., Watzke, H., Leser, M. E., & Miller, R. (2009). Lipases at interfaces: a review. *Advances in colloid and interface science*, 147-148, 237-50. Elsevier B.V. doi:10.1016/j.cis.2008.06.001
- Ribeiro, W. C., (2008). Políticas Públicas Ambientais no Brasil: Mitigação das Mudanças Climáticas. *Revista Electrónica de Geografía y Ciencias Sociales*. 270 (25). Retrieved from <http://www.ub.edu/geocrit/sn/sn-270/sn-270-25.htm>
- Rodrigues, M. I., Iemma, A. F., (2009). Planejamento de experimentos e otimização de processos. 2ª Ed. Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor. Campinas.
- Rosa, C. a, Jindamorakot, S., Limtong, S., Nakase, T., Lachance, M.–A., Fidalgo–Jiménez, A., Daniel, H.–M. et al. (2009). Synonymy of the yeast genera *Moniliella* and *Trichosporonoides* and proposal of *Moniliella fonsecae* sp. nov. and five new species combinations. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(Pt 2), 425–9. doi:10.1099/ijs.0.65117–0
- Rúa, M. L., Diaz–maurifio, T., Fernfindez, V. M., Otero, C., & Ballesteros, A. (1993). Purification and characterization of two distinct lipases from *Candida cylindracea*. *Biochimica et Biophysica acta*, 1156(2), 181–189.

- Ryu, H. S., Kim, H. K., Choi, W. C., Kim, M. H., Park, S. Y., Han, N. S., Oh, T. K., et al. (2006). New cold-adapted lipase from *Photobacterium lipolyticum* sp. nov. that is closely related to filamentous fungal lipases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70(3), 321-326. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16088345>
- Sabbaghian, E., & Roostaazad, R. (2005). Application of the Taguchi method to optimize the process conditions in the production of lipase by *Pseudomonas aeruginosa* B-3556. *Iranian Journal of Science & Technology, Transaction B, Engineering*, 29(B5), 5-12. Retrieved from [http://www.shirazu.ac.ir/En/files/extract\\_file.php?file\\_id=327](http://www.shirazu.ac.ir/En/files/extract_file.php?file_id=327)
- Saisubramanian, N., Sivasubramanian, S., Nandakumar, N., Indirakumar, B., Chaudhary, N. A., & Puvanakrishnan, R. (2008). Two step purification of *Acinetobacter* sp. lipase and its evaluation as a detergent additive at low temperatures. *Applied biochemistry and biotechnology*, 150(2), 139-56. doi:10.1007/s12010-008-8143-1
- Saka, S., Kusdiana, D., 2001. Biodiesel fuel from rapeseed oil as prepared in supercritical methanol. *Fuel* 80, 225-231. Elsevier Ltd. doi: 10.1016/S0016-2361(00)00083-1
- Salameh, M. a, & Wiegel, J. (2007). Purification and characterization of two highly thermophilic alkaline lipases from *Thermosyntropha lipolytica*. *Applied and environmental microbiology*, 73(23), 7725-31. doi:10.1128/AEM.01509-07
- Salihi, A., Alam, M. Z., AbdulKarim, M. I., & Salleh, H. M. (2012). Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. *Resources, Conservation and Recycling*, 58, 36-44. Elsevier B.V. doi:10.1016/j.resconrec.2011.10.007
- Sánchez-Otero, M. G., Ruiz-López, I. I., Avila-Nieto, D. E., & Oliart-Ros, R. M. (2011). Significant improvement of *Geobacillus thermoleovorans* CCR11 thermoalkalophilic lipase production using response surface methodology. *New biotechnology*, 28(6), 761-6. doi:10.1016/j.nbt.2011.01.010
- Saxena, R. K., Sheoran, A., Giri, B., & Davidson, W. S. (2003). Purification strategies for microbial lipases. *Journal of microbiological methods*, 52(1), 1-18. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12401222>
- Schenk, P., Thomas-Hall, S., & Stephens, E. (2008). Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenergy*, 1, 20-43. doi:10.1007/s12155-008-9008-8
- Schrag, J. D., Li, Y. G., Wu, S., & Cygler, M. (1991). Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*. *Nature*, 351(6329), 761-764. doi:10.1038/351761a0

- SCIENCEGATEWAY. 0.1M Phosphate buffer chart. Retrieved, from <http://www.sciencegateway.org/protocols/cellbio/appendix/phosb.htm> em 26/06/2012.
- Shahid, E. M., & Jamal, Y. (2011). Production of biodiesel: A technical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15(9), 4732–4745. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.rser.2011.07.079
- Sharma, P. K., Singh, K., Singh, R., Capalash, N., Ali, A., Mohammad, O., & Kaur, J. (2012). Characterization of a thermostable lipase showing loss of secondary structure at ambient temperature. *Molecular biology reports*, 39(3), 2795-804. doi:10.1007/s11033-011-1038-1
- Sharma, R., Chisti, Y., & Banerjee, U. C. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, 19(8), 627–662. Elsevier. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975001000866>
- Sidebottom, C. M., Charton, E., Dunn, P. P. J., Mycock, G., Davies, C., Sutton, J. L., Macrae, A. R. et al. (1991). *Geotrichum candidum* produces several lipases with markedly different substrate specificities. *Eur. J. Biochem*, 491(2), 485–491.
- Sifour, M., Zaghloul, T. I., Saeed, H. M., Berekaa, M. M., & Abdel-fattah, Y. R. (2010). Enhanced production of lipase by the thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* strain-5 using statistical experimental designs. *New biotechnology*, 27(4), 330–336. Elsevier. doi:10.1016/j.nbt.2010.04.004
- SIGMA-ALDRICH®, Purify! Gel filtration Chromatography, Retrieved from [http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/life-science/proteomics-and-protein/proteomics/protein-chromatography0.Par.0001.File.dat/chromatography\\_gel\\_filtration.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/life-science/proteomics-and-protein/proteomics/protein-chromatography0.Par.0001.File.dat/chromatography_gel_filtration.pdf) em (04/04/12)
- Silva, G. P. da, Mack, M., & Contiero, J. (2009). Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology advances*, 27(1), 30–9. Elsevier Inc. doi:10.1016/j.biotechadv.2008.07.006
- Simons, J. W., Adams, H., Cox, R. C., Dekker, N., Götz, F., Slotboom, A. J., & Verheij, H. M. (1996). The lipase from *Staphylococcus aureus*. Expression in *Escherichia coli*, large-scale purification and comparison of substrate specificity to *Staphylococcus hyicus* lipase. *The Federation of European Biochemical Societies Journal*, 242(3), 760-769. Retrieved from <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1432-1033.1996.0760r.x>
- Sinchaikul, S., Sookkheo, B., Phutrakul, S., Pan, F. M., & Chen, S. T. (2001). Optimization of a thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* P1: overexpression, purification, and characterization. *Protein Expression and*

- Purification, 22(3), 388-398. ACADEMIC PRESS INC. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11483000>
- Singh, A. K., & Mukhopadhyay, M. (2012). Overview of fungal lipase: a review. *Applied biochemistry and biotechnology*, 166(2), 486–520. doi:10.1007/s12010–011–9444–3
- SIX SIGMA GLOSSARY. (2009)  
[http://www.micquality.com/six\\_sigma\\_glossary/signal\\_noise\\_ratio.htm](http://www.micquality.com/six_sigma_glossary/signal_noise_ratio.htm) (acessado em 17/03/2012)
- Solá, R. J., & Griebenow, K. A. I. (2010). Effects of Glycosylation on the Stability of Protein Pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98(4), 1223–1245. doi:10.1002/jps.21504.Effects
- Tan, T., Lu, J., Nie, K., Deng, L., & Wang, F. (2010). Biodiesel production with immobilized lipase: A review. *Biotechnology advances*, 28(5), 628–34. Elsevier Inc. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.05.012
- Teng, Y., & Xu, Y. (2008). Culture condition improvement for whole–cell lipase production in submerged fermentation by *Rhizopus chinensis* using statistical method. *Bioresource technology*, 99(9), 3900–7. doi:10.1016/j.biortech.2007.07.057
- Thomas, C. D., Cameron, A., Green, R. E., Bakkenes, M., Beaumont, L. J., Collingham, Y. C., Erasmus, B. F. N. et al. (2004). Extinction risk from climate change. *Nature*, 427(6970), 145–148. Nature Publishing Group. doi:10.1038/nature02121
- Treichel, H., Oliveira, D., Mazutti, M. a., Luccio, M., & Oliveira, J. V. (2009). A Review on Microbial Lipases Production. *Food and Bioprocess Technology*, 3(2), 182–196. doi:10.1007/s11947–009–0202–2
- Tripoli, R., Malta, M., & Casagrande, R. (2008). *COMISSÃO MISTA ESPECIAL SOBRE MUDANÇAS CLIMÁTICAS* (p. 253). Retrieved from <http://www.senado.gov.br/atividade/materia/getPDF.asp?t=56862>
- Vakhlu, J., & Kour, A. (2006). Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9(1), 69–85. doi:10.2225/vol9–issue1–fulltext–9
- Varki A, Cummings RD, Esko JD et al., editors.(2009). Essentials of Glycobiology. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): [Cold Spring Harbor Laboratory Press](http://www.cshlpress.com/); 784pgs. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1926/>
- Vasudevan, P. T., & Briggs, M. (2008). Biodiesel production—current state of the art and challenges. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 35(5), 421–30. doi:10.1007/s10295–008–0312–2

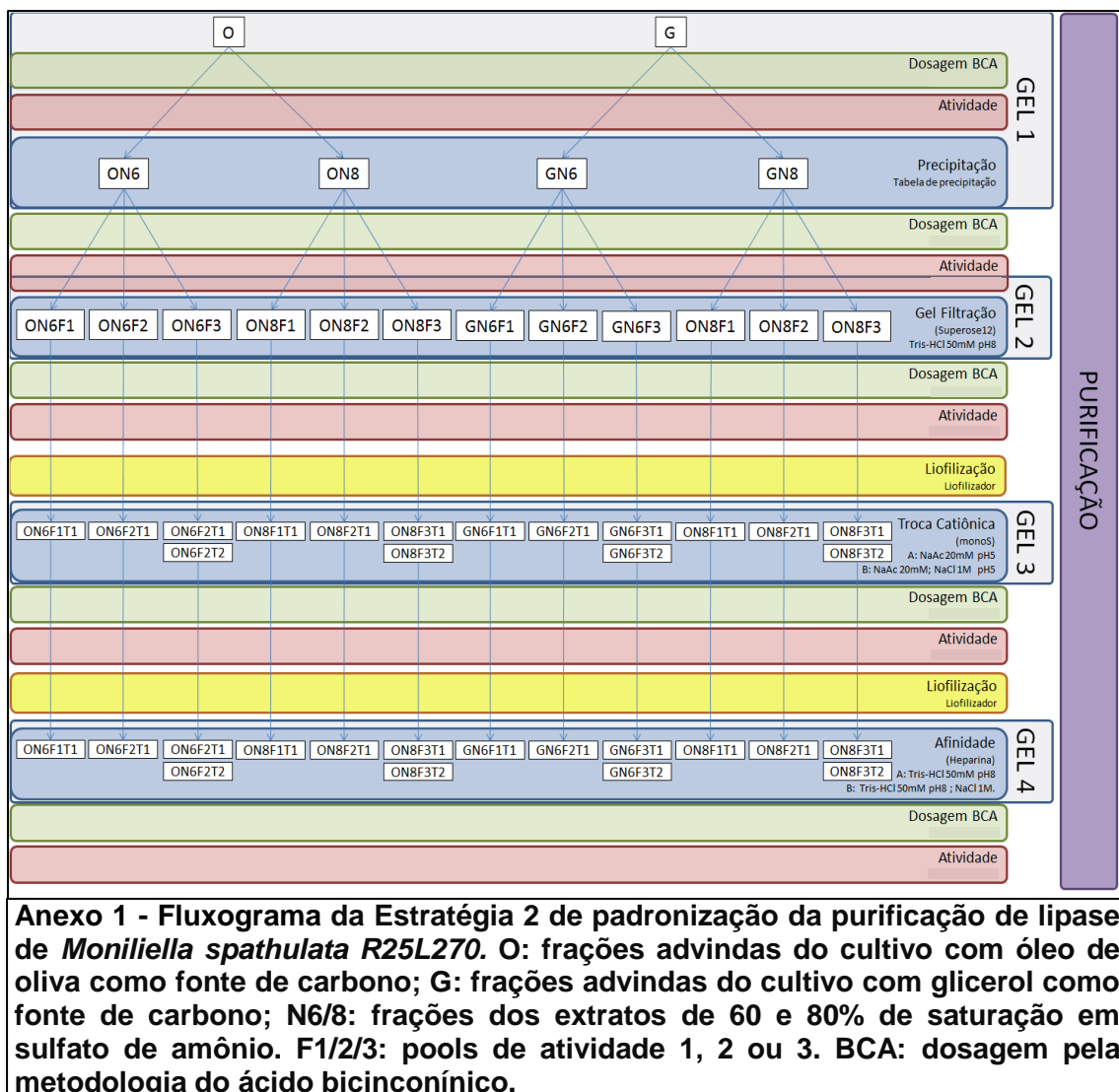
- Veljković, V. B., Avramović, J. M., & Stamenković, O. S. (2012). Biodiesel production by ultrasound–assisted transesterification: State of the art and the perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(2), 1193–1209. doi:10.1016/j.rser.2011.11.022
- Viana, F. R. (2009). TESE. Caracterização Microbiológica e Físico–Química do “Requeijão do Norte” Artesanal. Universidade Federal deminas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós–Graduação em Microbiologia. Acessado em <http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/handle/1843/MBSA-7ZLLYX> (22/02/2012).
- Volpato, G. (2009) TESE. Produção, purificação e imobilização de lipases de *Staphylococcus warneri* EX17 produzidas em glicerol. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Escola de Engenharia. Programa de Pós–Graduação em Engenharia Química. Acessado em <http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/15543> (16/02/2012).
- Wang, S.–L., Lin, Y.–T., Liang, T.–W., Chio, S.–H., ming, L.–J., & Wu, P.–C. (2009). Purification and characterization of extracellular lipases from *Pseudomonas monteilli* TKU009 by the use of soybeans as the substrate. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 36(1), 65–73. doi:10.1007/s10295–008–0473–z
- WEO, World Energy Outlook 2009, *OECD/IEA*, 2009
- Wilkins, M. R., Gasteiger, E. Bairoch, A. Sanchez, J. C. Williams, K. L., Appel, R. D., Hochstrasser, D. F. (1999) [Protein identification and analysis tools in the ExPASy server](#). *Methods In Molecular Biology Clifton Nj* 112 (6) p. 531-52 Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10027275>
- Wolski, E., Menusi, E., Mazutti, M., Toniazzo, G., Rigo, E., Cansian, R. L., Mossi, A. et al. (2008). Response Surface Methodology for Optimization of Lipase Production by an Immobilized Newly Isolated *Penicillium* sp. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 47, 9651–9657. ACS Publications. Retrieved from <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ie800658j>
- Yadav, R. P., Saxena, R. K., Gupta, R., & Davidson, W. S. (1998). Purification and characterization of a regiospecific lipase from *Aspergillus terreus*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 28 (Pt3)(3), 243-249. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9799723>
- Yu, D., Tian, L., Wu, H., Wang, S., Wang, Y., Ma, D., & Fang, X. (2010). Ultrasonic irradiation with vibration for biodiesel production from soybean oil by Novozym 435. *Process Biochemistry*, 45(4), 519–525. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.procbio.2009.11.012
- Zhang, J., Lin, S., & Zeng, R. (2007). Cloning, expression, and characterization of a cold-adapted lipase gene from an antarctic deep-sea psychrotrophic bacterium, *Psychrobacter* sp 7195. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(4), 604–

610. Korean Society for Applied Microbiology. Retrieved from <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=18712516>

Zhang, J.-W., & Zeng, R.-Y. (2008). Molecular cloning and expression of a cold-adapted lipase gene from an Antarctic deep sea psychrotrophic bacterium *Pseudomonas* sp. 7323. *Marine biotechnology New York NY*, 10(5), 612-621. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18461394>



## ANEXOS





**Anexo 2 – Planejamento Fatorial de níveis mistos L18: Variáveis codificadas**

	Fonte C	[C]	Fonte N	[N]	Sal KPO <sub>4</sub>	pH
1	1	1	1	1	2	2
2	2	2	1	2	1	1
3	1	2	1	2	1	1
4	2	1	1	1	2	2
5	1	2	1	1	1	2
6	2	1	1	2	2	1
7	1	1	3	2	2	1
8	2	2	3	1	1	2
9	1	1	3	2	1	2
10	2	2	3	1	2	1
11	1	2	3	1	2	1
12	2	1	3	2	1	2
13	1	2	2	2	2	2
14	2	1	2	1	1	1
15	1	1	2	1	1	1
16	2	2	2	2	2	2
17	1	1	2	1	1	1
18	2	2	2	2	2	2

**Anexo 3 – Resultados de atividade enzimática do sobrenadante dos tratamentos do Planejamento Fatorial de níveis mistos L18. As variáveis representadas não codificadas têm seus níveis representados em %<sub>(m/v)</sub>**

Trat	Fonte C	[C]	Fonte N	[N]	Sal KPO <sub>4</sub>	pH	Peptona	Atividade lipásica (U.L <sup>-1</sup> )
1	glicerol	2,0	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,2	1,00	8,0	0,02	3,027
2	óleo de oliva	12,0	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,0	0,03	6,5	0,02	10,559
3	glicerol	12,0	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,0	0,03	6,5	0,02	2,609
4	óleo de oliva	2,0	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,2	1,00	8,0	0,02	1,468
5	glicerol	12,0	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,2	0,03	8,0	0,02	0,859
6	óleo de oliva	2,0	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,0	1,00	6,5	0,02	6,299
7	glicerol	2,0	Uréia	2,0	1,00	6,5	0,02	0,555
8	óleo de oliva	12,0	Uréia	0,2	0,03	8,0	0,02	88,802
9	glicerol	2,0	Uréia	2,0	0,03	8,0	0,02	0,384
10	óleo de oliva	12,0	Uréia	0,2	1,00	6,5	0,02	17,044
11	glicerol	12,0	Uréia	0,2	1,00	6,5	0,02	0,422
12	óleo de oliva	2,0	Uréia	2,0	0,03	8,0	0,02	0,555
13	glicerol	12,0	NaNO <sub>3</sub>	2,0	1,00	8,0	0,02	71,723
14	óleo de oliva	2,0	NaNO <sub>3</sub>	0,2	0,03	6,5	0,02	24,918
15	glicerol	2,0	NaNO <sub>3</sub>	0,2	0,03	6,5	0,02	2,669
16	óleo de oliva	12,0	NaNO <sub>3</sub>	2,0	1,00	8,0	0,02	67,657
17	glicerol	2,0	NaNO <sub>3</sub>	0,2	0,03	6,5	0,02	1,164
18	óleo de oliva	12,0	NaNO <sub>3</sub>	2,0	1,00	8,0	0,02	44,165

**Trat = tratamento**

**Anexo 4 – Volume a ser adicionado (mL) das soluções estoques (0,5g/L) para preparação de cultivo de 150mL**

Trat	Fonte de C (tipo e volume)		Fonte de N (tipo e volume)		fosfato de potássio		Peptona	H <sub>2</sub> O
					<a href="#">Monob</a>	<a href="#">Dibásico</a>		
1	glicerol	3,0	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,6	0,372	3,112	0,3	142,62
2	óleo de oliva	9,0	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6,0	0,169	0,043	0,3	134,49
3	glicerol	9,0	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6,0	0,169	0,043	0,3	134,49
4	óleo de oliva	3,0	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,6	0,372	3,112	0,3	142,62
5	glicerol	9,0	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,6	0,011	0,093	0,3	140,00
6	óleo de oliva	3,0	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6,0	5,628	1,418	0,3	133,65
7	glicerol	3,0	Uréia	6,0	5,628	1,418	0,3	133,65
8	óleo de oliva	9,0	Uréia	0,6	0,011	0,093	0,3	140,00
9	glicerol	3,0	Uréia	6,0	0,011	0,093	0,3	140,60
10	óleo de oliva	9,0	Uréia	0,6	5,628	1,418	0,3	133,05
11	glicerol	9,0	Uréia	0,6	5,628	1,418	0,3	133,05
12	óleo de oliva	3,0	Uréia	6,0	0,011	0,093	0,3	140,60
13	glicerol	9,0	NaNO <sub>3</sub>	6,0	0,372	3,112	0,3	131,22
14	óleo de oliva	3,0	NaNO <sub>3</sub>	0,6	0,169	0,043	0,3	145,89
15	glicerol	3,0	NaNO <sub>3</sub>	0,6	0,169	0,043	0,3	145,89
16	óleo de oliva	9,0	NaNO <sub>3</sub>	6,0	0,372	3,112	0,3	131,22
17	glicerol	3,0	NaNO <sub>3</sub>	0,6	0,169	0,043	0,3	145,89
18	óleo de oliva	9,0	NaNO <sub>3</sub>	6,0	0,372	3,112	0,3	131,22

na preparação dos frascos de cultivo, deveriam ser adicionadas as quantidades indicadas de cada substância através dos volumes estipulados nas linhas referentes aos respectivos frascos. Adicionou-se soluções estoque dos componentes acima, excetuando-se as fontes de carbono (glicerol ou óleo de oliva). Trat = tratamento

**Anexo 5 – Plano fatorial de níveis mistos L36**

RUN	Fonte C	Fonte N	pH	[C]	[N]	CaCl <sub>2</sub>	fosfato	MgSO <sub>4</sub>
1	glicerol	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	6,5	0,5	0,2	0,1	0,05	0,05
2	glicerol	Uréia	6,5	0,5	0,2	0,1	0,05	0,05
3	glicerol	NaNO <sub>3</sub>	6,5	0,5	0,2	0,1	0,05	0,05
4	glicerol	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	8,0	0,5	0,2	0,1	5,00	0,05
5	glicerol	Uréia	8,0	0,5	0,2	0,1	5,00	0,05
6	glicerol	NaNO <sub>3</sub>	8,0	0,5	0,2	0,1	5,00	0,05
7	glicerol	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	6,5	0,5	2,0	1,0	0,05	1,50
8	glicerol	Uréia	6,5	0,5	2,0	1,0	0,05	1,50
9	glicerol	NaNO <sub>3</sub>	6,5	0,5	2,0	1,0	0,05	1,50
10	glicerol	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	8,0	12,0	2,0	1,0	0,05	0,05
11	glicerol	Uréia	8,0	12,0	2,0	1,0	0,05	0,05
12	glicerol	NaNO <sub>3</sub>	8,0	12,0	2,0	1,0	0,05	0,05
13	glicerol	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	6,5	12,0	0,2	1,0	5,00	1,50
14	glicerol	Uréia	6,5	12,0	0,2	1,0	5,00	1,50
15	glicerol	NaNO <sub>3</sub>	6,5	12,0	0,2	1,0	5,00	1,50
16	glicerol	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	8,0	12,0	2,0	0,1	5,00	1,50
17	glicerol	Uréia	8,0	12,0	2,0	0,1	5,00	1,50
18	glicerol	NaNO <sub>3</sub>	8,0	12,0	2,0	0,1	5,00	1,50
19	óleo de oliva	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	8,0	0,5	2,0	0,1	0,05	1,50
20	óleo de oliva	Uréia	8,0	0,5	2,0	0,1	0,05	1,50
21	óleo de oliva	NaNO <sub>3</sub>	8,0	0,5	2,0	0,1	0,05	1,50
22	óleo de oliva	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	8,0	0,5	0,2	1,0	5,00	1,50
23	óleo de oliva	Uréia	8,0	0,5	0,2	1,0	5,00	1,50
24	óleo de oliva	NaNO <sub>3</sub>	8,0	0,5	0,2	1,0	5,00	1,50
25	óleo de oliva	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	6,5	0,5	2,0	1,0	5,00	0,05
26	óleo de oliva	Uréia	6,5	0,5	2,0	1,0	5,00	0,05
27	óleo de oliva	NaNO <sub>3</sub>	6,5	0,5	2,0	1,0	5,00	0,05
28	óleo de oliva	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	6,5	12,0	0,2	0,1	0,05	1,50
29	óleo de oliva	Uréia	6,5	12,0	0,2	0,1	0,05	1,50
30	óleo de oliva	NaNO <sub>3</sub>	6,5	12,0	0,2	0,1	0,05	1,50
31	óleo de oliva	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	6,5	12,0	2,0	0,1	5,00	0,05
32	óleo de oliva	Uréia	6,5	12,0	2,0	0,1	5,00	0,05
33	óleo de oliva	NaNO <sub>3</sub>	6,5	12,0	2,0	0,1,	5,00	0,05
34	óleo de oliva	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	8,0	12,0	0,2	1,0	0,05	0,05
35	óleo de oliva	Uréia	8,0	12,0	0,2	1,0	0,05	0,05
36	óleo de oliva	NaNO <sub>3</sub>	8,0	12,0	0,2	1,0	0,05	0,05

**Os valores acima representados indicam concentrações em %**

**Anexo 6 – Plano fatorial de níveis mistos L36 com níveis reais das variáveis.**

Fonte C	[C]	[N]	fosfato	pH	MgSO <sub>4</sub>	Fonte N
glicerol	0,5	0,2	0,05	6,5	0,05	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
glicerol	0,5	0,2	0,05	6,5	0,05	Uréia
glicerol	0,5	0,2	0,05	6,5	0,05	NaNO <sub>3</sub>
glicerol	0,5	0,2	0,05	6,5	1,00	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
glicerol	0,5	0,2	0,05	6,5	1,00	Uréia
glicerol	0,5	0,2	0,05	6,5	1,00	NaNO <sub>3</sub>
glicerol	0,5	2,0	5,00	8,0	0,05	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
glicerol	0,5	2,0	5,00	8,0	0,05	Uréia
glicerol	0,5	2,0	5,00	8,0	0,05	NaNO <sub>3</sub>
glicerol	12,0	0,2	5,00	8,0	0,05	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
glicerol	12,0	0,2	5,00	8,0	0,05	Uréia
glicerol	12,0	0,2	5,00	8,0	0,05	NaNO <sub>3</sub>
glicerol	12,0	2,0	0,05	8,0	1,00	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
glicerol	12,0	2,0	0,05	8,0	1,00	Uréia
glicerol	12,0	2,0	0,05	8,0	1,00	NaNO <sub>3</sub>
glicerol	12,0	2,0	5,00	6,5	1,00	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
glicerol	12,0	2,0	5,00	6,5	1,00	Uréia
glicerol	12,0	2,0	5,00	6,5	1,00	NaNO <sub>3</sub>
óleo de oliva	0,5	2,0	5,00	6,5	0,05	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
óleo de oliva	0,5	2,0	5,00	6,5	0,05	Uréia
óleo de oliva	0,5	2,0	5,00	6,5	0,05	NaNO <sub>3</sub>
óleo de oliva	0,5	2,0	0,05	8,0	1,00	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
óleo de oliva	0,5	2,0	0,05	8,0	1,00	Uréia
óleo de oliva	0,5	2,0	0,05	8,0	1,00	NaNO <sub>3</sub>
óleo de oliva	0,5	0,2	5,00	8,0	1,00	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
óleo de oliva	0,5	0,2	5,00	8,0	1,00	Uréia
óleo de oliva	0,5	0,2	5,00	8,0	1,00	NaNO <sub>3</sub>
óleo de oliva	12,0	2,0	0,05	6,5	0,05	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
óleo de oliva	12,0	2,0	0,05	6,5	0,05	Uréia
óleo de oliva	12,0	2,0	0,05	6,5	0,05	NaNO <sub>3</sub>
óleo de oliva	12,0	0,2	5,00	6,5	1,00	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
óleo de oliva	12,0	0,2	5,00	6,5	1,00	Uréia
óleo de oliva	12,0	0,2	5,00	6,5	1,00	NaNO <sub>3</sub>
óleo de oliva	12,0	0,2	0,05	8,0	0,05	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
óleo de oliva	12,0	0,2	0,05	8,0	0,05	Uréia
óleo de oliva	12,0	0,2	0,05	8,0	0,05	NaNO <sub>3</sub>

**Os valores acima representados indicam concentrações em %**


## Anexo 7 – Tabela de concentração de saturação de sulfato de amônio

**AMMONIUM SULPHATE TABLE**

This table indicates the grams of solid ammonium sulfate (at 25°C) to be added to one liter of solution to produce a desired change in the percent saturation of ammonium sulfate. Saturated ammonium sulfate at 25°C is 4.1M and requires 767 grams of salt per liter. "Percent saturation" in this table is percent of 4.1M. The listed values were calculated from tables of percent salt, specific gravity and grams per liter at various concentrations. This table is an extension of the widely used one published in *Methods in Enzymology* [A. A. Green and W. L. Hughes in *Methods Enzymol* 1, 67-90 (1955), Edited by S. P. Colowick and N. O. Kaplan]

**Final Concentration of Ammonium Sulfate  
Per Cent Saturation**

Initial Concentration of Ammonium Sulfate Per Cent Saturation	Final Concentration of Ammonium Sulfate Per Cent Saturation																			
	10	15	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
0	56	84	114	144	176	196	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561	610	662	713	767
10		28	57	86	118	137	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494	540	592	640	694
15			28	57	88	107	120	153	185	220	256	294	333	373	415	459	506	556	605	657
20				29	59	78	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424	471	520	569	619
25					30	49	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390	436	485	533	583
30						19	30	62	94	127	162	198	235	273	314	356	401	449	496	546
33							12	43	74	107	142	177	214	252	292	333	378	426	472	522
35								31	63	94	129	164	200	238	278	319	364	411	457	506
40									31	63	97	132	168	205	245	285	328	375	420	469
45										32	65	99	134	171	210	250	293	339	383	431
50											33	66	101	137	176	214	256	302	345	392
55												33	67	103	141	179	220	264	307	353
60													34	69	105	143	183	227	269	314
65														34	70	107	147	190	232	275
70															35	72	111	153	194	237
75																36	74	115	155	198
80																	38	77	117	157
85																		39	77	118
90																			38	77


**P.L. biochemicals, inc.**  
 1037 WEST MCKINLEY AVENUE, MILWAUKEE, WIS. 53205